

**Kreislauffeffekte niedermolekularer Bestandteile
des Kalbsmyokards am Kaninchen**

Reinhilde Schmid

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551911_0029

Aus der Medizinischen Poliklinik der
Universität München
Direktor: Professor Dr. N. Zöllner

Kreislauffeffekte niedermolekularer
Bestandteile des Kalbsmyokards am
Kaninchen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der ge-
samten Medizin an der Ludwig Maximilians-
Universität zu München

vorgelegt von
Reinhilde Schmid
aus München

Mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Nowy

Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. April 1975



Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

B. Methodik

I. Extrakterstellung

1. Gewinnung der Kalbsherzen
2. Präparation und Homogenisierung
3. Extraktion, Ultrazentrifugierung

II. Trennungsmethoden

1. Ultrafiltration
2. Gelchromatographie
 - a) Versuchsaufbau
 - b) Versuchsdurchführung

III. Tierversuche

1. Beschreibung der verwendeten Geräte
2. Versuchsaufbau und -vorbereitung
3. Versuchsdurchführung

C. Ergebnisse

I. Gelchromatographie

II. Tierversuche

D. Diskussion

I. Methoden

II. Ergebnisse

E. Zusammenfassung

F. Literaturverzeichnis

A. Einleitung

Aus tierischen und menschlichen Geweben wie aus Urin und Plasmaextrakten konnten bisher mit Methoden der Hochspannungselektrophorese (1,2), der trägerfreien Elektrophorese, und Gelfiltration niedermolekulare Substanzen, Peptide und Amine, isoliert werden, die unter bestimmten Umständen aus diesen Geweben freigesetzt oder aus inaktiven Vorstufen im Plasma gebildet und an einem Erfolgsorgan wirksam werden können. Hierzu zählen Gewebshormone mit Polypeptidcharakter wie die Kinine Bradykinin und Kallidin (3) ebenso wie blutdruckwirksame Amine z.B. Serotonin und Histamin (4)

Neben diesen definierten Substanzen sind z.Z. eine Vielzahl in ihrem Aufbau noch unbekannte Peptide in der Diskussion zur Aufklärung der Pathogenese z.B. des cardiogenen Schocks und der essentiellen Hypertonie, um nur zwei Forschungskomplexe zu nennen. Wollheim (5) konnte aus dem Harnextrakt von normo- und hypertonen Nierenkranken ein vasoaktives Gemisch von zwei Polypeptiden isolieren, das im Urin essentieller Hypertoniker nicht nachgewiesen werden kann. Die Arbeitsgruppe um Lefer (6) fand im Plasma von Hunden im cardiogenen Schock einen "myocardial depressant factor", der wahrscheinlich als niedermolekulares Peptid (Molekulargewicht ca. 800) aus inaktiven Plasmavorstufen gebildet wird unter dem Einfluß von lysosomalen Enzymen.

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Vorstellung, daß auch im Herzmuskelgewebe, aus dem bisher erst wenige Peptide isoliert wurden wie Glutathion und Anserin (7), niedermolekulare Bestandteile enthalten sind, die unter bestimmten pathologischen Bedingungen (Gewebeerfall, Entzündung) freigesetzt werden und dann eine pharmakologische Wirkung auf den Kreislauf entfalten

können.

Deshalb haben wir einen Extrakt von niedermolekularen Bestandteilen des Kalbsmyokards hergestellt, ihn gelchromatographisch und mit Ultrafiltration aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen auf ihre Wirkung auf den arteriellen Blutdruck und die Herzfrequenz des Kaninchen getestet.

B. Methodik

I. Extrakterstellung

1. Gewinnung der Kalbsherzen

Zur Herstellung eines Myokardextraktes verwendeten wir vier Kalbsherzen aus dem Schlachthof. Ca. fünf Minuten nach der Tötung der Tiere mit einem Schußapparat wurden die warmen Herzen entnommen. Mit Hilfe eines in die Aorta distal der Aortenklappe eingebundenen Gummischlauches spülten wir die Koronargefäße, bis das aus dem venösen Schenkel abfließende Spülmittel (warme physiologische Kochsalzlösung) klar erschien. Die auf diese Weise entbluteten Herzen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Die oben beschriebene Gewinnung des Materials scheint uns am ehesten die von uns geforderten Bedingungen zu erfüllen: Zum einen sollte das Material von gesunden, jungen Tieren stammen, um Myokardveränderungen durch Vergiftungen, Koronarsklerose oder herzwegewebszerstörende Prozesse möglichst auszuschließen. Hier mußten wir uns auf die Routineprüfung der Fleischschau verlassen. Zum anderen sollte das Material so weit wie möglich vor postmortalen Veränderungen geschützt werden, was wir durch schnelle Organentnahme nach dem Tod, rasche Verarbeitung und sofortige Einbettung in flüssigen Stickstoff zu erreichen versuchten. Die Herzen befanden sich innerhalb von 15 Minuten nach der Tötung in einem Zustand bei -196°C , geschützt vor Autolyse und bakterieller Zersetzung.

2. Präparation und Homogenisierung

Noch im gefrorenen Zustand wurden Fettgewebe, Gefäßstamm und sonstiges Bindegewebe wie Endokardfasern abpräpariert, Ventrikel- und Vorhof-

gewebe getrennt, im Eisbad bei 0°C zerkleinert und eingewogen. Das Vorhofgewebe froren wir zur weiteren Verwendung ein. Aufgefüllt mit aqua bidest im Verhältnis 1 : 2 wurde das Kammergewebe 1 - 3 Minuten bei 0°C homogenisiert (Homogenisator E. Bühler, Tübingen, 7000 U/min).

Die Daten der vier Herzen:

Herz Nr.	Entnahme	Kammergewicht	Vorhofgewicht	gelöst in aqua bidest.
I	16. 11. 71	587,5 g	84 g	1175 ml
II	16. 11. 71	515,0 g	87 g	1030 ml
III				
IV	23. 11. 71	953,0 g	130 g	1906 ml

3. Extraktion, Ultrazentrifugierung

Um weitere Bestandteile des Herzgewebes in Lösung zu bringen, wurde das Homogenat im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ 24 Stunden mit einem elektrischen Rührer durchgerührt. Nach 20 - minütigem Zentrifugieren bei 3000 g und 0°C wurde das abgetrennte Sediment mit 200 ml aqua dest. aufgeschwemmt und nochmals 20 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. (Kühlzentrifuge Christ, Osterode Typ 2 KS). Den so gewonnenen, fleischfarbenen klaren Überstand unterzogen wir der Ultrazentrifugierung (Beckman Ultrazentrifuge L 2, Rotor 30) drei Stunden lang bei 19000 U/min. Das Sediment verwarfen wir, der Überstand wurde gefriergetrocknet mit Hilfe einer Kältemischung von Äthanol und Trockeneis bei -50°C bis -60°C im Vakuum (Öl-Rotations-Vakuumpumpe Vacuubrand Typ RZ 12, Endpartialdruck 6×10^{-5} Torr). Auf diese Weise gewannen wir 70,5 g Ventrikelmateri- al als Pulver.

II. Trennungsmethoden

1. Ultrafiltration

Da wir nur niedermolekulare, eiweißfreie Bestand-

teile des Myokards untersuchen wollten, mußten wir Substanzen mit einem Molekulargewicht von größer als 30.000 abtrennen. Die Methode der Ultrafiltration war dazu geeignet: Nahtlose Zellolose-Dialyseschläuche (LKB-Produkter AB, 6390-1) wurden auf Nylon-Körbe (LKB 6301 A) aufgezogen und durch doppelte Knotung unten abgeschlossen, in eine 3 %ige aqua dest.-Lösung des Materials getaucht und zur Beschleunigung der Auftrennung luftdicht an eine Wasserstrahlvakuumpumpe angeschlossen. Die Körbe, die sich ständig in einem Eisbad befanden, wurden regelmäßig alle 2 - 3 Stunden nach Einstellung eines Gleichgewichts an der Dialysemembran entleert. Substanzen mit einem größeren Molekulargewicht als 30.000, die den Ultrafilter nicht passieren konnten, wurden für andere Zwecke gefriergetrocknet, während die niedermolekularen Substanzen nach der Lyophilisierung als 5 %ige aqua bidest.-Lösung weiter auftrennenden Diaflo-Membranfiltern zugeführt wurden(Fa. Amicon).

Produkte der Ultrafiltration in gefriergetrocknetem Zustand:

Filter	Molekulargewicht	Menge	Bezeichnung
PM 10	ca 30000 - 10000	0.76 g	K(=Kalb) A
UM 2	ca 10000 - 1000	0.06 g	K B
UM 0.5	ca 1000 - 500	0.476 g	K C
Rest	ca unter 500	9.233 g	K D

2. Gelchromatographie

Zur weiteren Auftrennung unserer Myokardfraktionen unterzogen wir das Material einer Gelchromatographie, mit deren Hilfe sich Substanzen nach der Molekülgröße aufspalten lassen. Gelfiltration

mit dem Dextrangel Sephadex^R ist ein chromatographisches Trennungsverfahren, das auf der eingeschränkten Diffusion von Molekülen in einer mit Gelpartikeln gefüllten Säule beruht (8). Das zu fraktionierende Substanzgemisch durchläuft ein Säulensystem, das besteht aus einer dispersierten Substanz (stationäre Phase) - einem granulierten, wasserlöslichen, quellbaren Gel aus Dextran und Epichlorhydrin mit dreidimensional vernetzten Polysaccharidketten - und einem Dispersionsmittel (Lösungsmittel = mobile Phase), das die Säule mit konstanter Geschwindigkeit durchströmt. In dem Elutionsmittel gelöste kleine Moleküle können während ihres Säulendurchflusses durch Poren deren Größe vom Vernetzungsgrad der stationären Phase abhängt in das Gelgerüst hindiffundieren und werden so länger im Gel festgehalten als Makromoleküle, die in das Gel nicht eindringen können und somit das System mit dem Elutionsmittel am schnellsten wieder verlassen. Die Diffusion hängt somit für eine bestimmte Substanz ab vom Verhältnis Molekülgröße zu Porengröße. Die Einstellung des Diffusionsgleichgewichts konnte durch die Vergrößerung der Grenzfläche bei Verwendung granulierter Gele erheblich beschleunigt werden. Seit Determan (8) hat sich die Bezeichnung Gelchromatographie eingebürgert, da bei diesem Verfahren in Lösungsmittel gelöste Substanzen einen unlöslichen Stoff percolieren und dabei aufgetrennt werden können. Andrews (9) konnte bestätigen, daß die Elutionsvolumina bestimmter Verbindungen über einen weiten Bereich von ihrer Molekülgröße abhängen. Somit ist es möglich unter Berücksichtigung von Packungsdichte des Gels und Durchflußdruck eine Eichkurve der Säule für Molekulargewichtsschätzungen in Abhängigkeit von den Elutionsvolumina aufzustellen (10). Die Eichung der von uns verwendeten Säule unterblieb, da wir keine MG - Bestimmungen

durchführten, sondern uns auf eine qualitative Fraktionierung beschränkten.

a) Versuchsaufbau

Eine 1 m lange Chromatographiesäule mit einem Fassungsvermögen von 800 ml und einem Durchmesser von 32 mm (Säule LKB 6300) war mit Sephadex-Gel G 10 gefüllt. (Pharmacia Uppsala, Schweden). Die technischen Daten des Gels: 40 - 120 μ Korngröße, H₂O-Aufnahmevermögen 1,0 $\pm$ 0,1 ml/g, Ausschlußgrenze: Substanzen mit mehr als 700 Molekulargewicht, Gelvolumen 2 -3 ml/g trockenes Sephadex. Als Elutionsmittel diente sorgfältig evakuiertes aqua bidestillata, das aus einer Vorratsflasche die Säule mit konstanter Temperatur (+ 8 ° C) und konstantem Durchfluß durchströmte, der mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Heidolph Elektro KG Type D 73, 2700 U/min) eingestellt wurde. Das Eluat durchfloß eine Photozelle, Wellenlänge 253,7 nm (Uvicord, LKB 4701 A) und wurde von einem Fraktionssammler aufgefangen (Radi Rac, LKB 3400 B) mit halbstündlichem Wechsel der Fraktionen. Die Transmissionsänderungen entsprechend den Konzentrationsänderungen des Eluats wurden mit einem Fallbügelschreiber (LKB 6520 A) aufgezeichnet.

b) Versuchsdurchführung

Nach der Säulenfüllung erfolgte der Probenauftrag. 1-4 ml einer 4-10 %igen Lösung von KA und KD (Versuche mit KC und KB s. (11)) in aqua bidest. wurden 10 Minuten bei 4000 U/min und 0 ° C zentrifugiert, zur Erhöhung des spezifischen Gewichts mit einer Spatelspitze Saccharose (Molekulargewicht 342,30) versetzt und langsam mit einer Polyäthylenkanüle in den über der Geloberfläche

befindlichen Lösungsmittelüberstand eingebracht ohne die Geloberfläche aufzuwirbeln. Darauf wurde der die Säule verschließende Stempel luftblasenfrei eingesetzt.

Durchgeführte Versuche:

Name	Menge (ml)	Konzentration (% in aqua bi- dest.)	Molekulargewichts- bereich
K A I	3.0	10	30000 - 10000
K A II	3.0	5	30000 - 10000
K A III	3.0	20	30000 - 10000
K A IV	3.0	5.3	30000 - 10000
K D I	3.0	10	- 500
K D II	3.0	10	- 500
K D III	3.0	10	- 500
K D IV	3.0	10	- 500

Die gesammelten Fraktionen wurden nach Volumenkontrolle (stichprobenartig) entweder einzeln oder in Gruppen, die einem Gipfel der Transmission entsprachen, zur weiteren Verarbeitung gefriergetrocknet und mit Fraktionsnummern versehen (s. Tab. Nr. 2)

III. Tierversuche

Nach der Gewinnung von einzelnen, reproduzierbaren Fraktionen niedermolekularer eiweißfreier Bestandteile des Kalbsmyokards untersuchten wir im zweiten Teil der Arbeit deren Kreislaufwirkung am Kaninchen. Diese Testung des Materials sollte Aufschluß geben über Änderungen des systolischen und diastolischen Drucks in der a. carotis communis des arteriellen Mitteldrucks, der Herzfrequenz.

1. Beschreibung der verwendeten Geräte

Das Atlasdruckmeßgerät EM 50 diene uns zur blutigen Druckmessung mittels einer in die a. carotis comm. eingebundenen Kanüle. Druckrezeptor ist ein Druckelement von Statham - Laboratories USA (Statham physiological pressure transducer nr. P 23 AA). Das Meßgerät erlaube die Auswahl der Druck-Meßbereiche 20, 50, 100 und 200 mmHg. Die gleichgerichtete Ausgangsspannung wird dem Registriergerät Atlas - Universal - Vierfach - Schreiber EM 43 a zugeleitet.

2. Versuchsaufbau und -vorbereitung

Ein nüchternes ca. 2,5 - 3,5 kg schweres gesundes Kaninchen wurde mit 20 % iger Urethanlösung in eine Ohrvene narkotisiert. Die Menge des Narkotikums schwankte von 2,50 - 4,65 ml/kg Körpergewicht. Die Schwankungen ergeben sich, da wir nicht schematisch dosierten, sondern individuell, bis eine genügende Muskeler schlaffung bei fehlendem Kornealreflex eingetreten war. Das narkotisierte Tier wurde nach der Wägung auf einen Aluminium-Versuchstisch mit dem Rücken nach unten aufgespannt, d.h. die Extremitäten in verstellbare Halterungen eingeklemmt, der Kopf bei etwas überstrecktem Hals mit einer Metallgabel fixiert. Nach Abrasieren des Fells zwischen den Clavikeln und dem Unterkiefer begannen wir die Präparation mit einem ca. 5 cm langen Hautschnitt in der Medianlinie 2 - 3 cm oberhalb der Klavikula. Lateral des linken m. sternocleidomastoideus wurde stumpf in die Tiefe präpariert bis zum Auffinden der vena jugularis interna, diese in einer Länge von 2 - 3 cm von dem umgebenden Bindegewebe so weit wie möglich befreit und von zwei Baumwollfäden

umschlungen. Medial des rechten m. sternocleidomastoideus wurde ebenfalls stumpf die a. carotis comm. aufgesucht, von n. vagus und der begleitenden Vene isoliert und ebenfalls nach ihrer Darstellung von Fädchen umschlungen. Die freigelegte v. jugularis stachen wir mit einer Braunüle an, führten diese ein und banden sie mit den vorbereiteten Fäden ein. Anschließend sofortige Heparinsisierung: 1 ml einer Lösung von 77 mg Heparin in 2 ml physiologische Kochsalzlösung = 5000 I.E. Heparin, um die Bildung von Koageln an den eingebundenen Kanülen zu verhindern. Die a. carotis comm. wurde distal abgebunden und proximal davon im Abstand von etwa 2 cm mit einer leichten Klemme abgeklemmt. In das mit einem Stilet angestochene Gefäß wurde eine 10 cm lange Kanüle eingeführt, bis zur Klemme vorgeschoben - was sich manchmal schwierig gestaltete, da die Arterie sich meist kontrahierte - die Klemme gelöst und die Kanüle eingebunden. Die Präparation dauerte 1 - 1,5 Stunden. Anschließend füllten wir das Manometer des Statham-Druckelements luftfrei mit Kochsalz-Lösung, montierten es in Horizontallage etwa in Höhe des Herzens des Kaninchens und glichen das Gerät auf Null ab. In die Achselfalten der Vorder- und Hinterbeine steckten wir nadelförmige Elektroden ein, verbanden sie mit dem geerdeten Atlas-Gerät und überprüften den richtigen Sitz derselben mit Hilfe des Oscilloskops. (Die Auswertung der EKGs erfolgt in einer späteren Arbeit). Nach Lösung der zu testenden Substanz in lauwarmer Kochsalzlösung war die Vorbereitung des Versuchs beendet.

3. Versuchsdurchführung

Der erste Abschnitt des Versuchs bestand aus Nullmessung des Druckes zur Gewinnung einer Null-

linie für die Druckablesung. Zu diesem Zweck wurde das Gummiverbindungsstück zwischen eingebundener Kanüle und Manometer auf Höhe der Membran des Manometers gehalten und aufgezeichnet. Während dieser Nullmessung führten wir auch die Druckeichung von 20 mmHg durch. Anschließend wurde der Mandrin mit dem Manometer über einen Dreiwegehahn verbunden: es konnten nun Ausgangsdruck und Ausgangs-EKG aufgezeichnet werden. Die Papiergeschwindigkeit betrug 50 mm/sec vor und während der Injektion der Testsubstanz und zusätzlich noch 100 mm/sec post-injektiv.

Die Aufzeichnung eines Versuchs sah damit folgendermaßen aus:

- Geschwindigkeit 50 vor der Injektion
- Injektion, kenntlich gemacht durch EKG-Eichmarke zu Beginn und Ende, Geschwindigkeit 50
- postinjektiv Geschwindigkeit 50 und 100
- bei den Minuten 1, 2 , 3, 4, 5, 10 nach der Injektion ebenfalls Geschwindigkeit 50 und 100.

Nach der 10-Minuten-Messung wurde meist etwa 5 Minuten gewartet bis zur Injektion der nächsten Probe, so daß pro Kaninchen 5 - 10 Proben i.v. gespritzt werden konnten. Beendet wurden die Versuche nach 3 - 5 Stunden durch Luftembolie, da nach dieser Zeit eine Kreislaufstabilität nicht mehr gewährleistet schien.

Es wurden 11 Tierversuche durchgeführt, wobei die Ergebnisse der Tiere Nr. 1, 2, 3, 4 bei Einhäupl (11) ausgewertet werden. Hase Nr. 5 und 9 verbluteten vor Beginn der Testung. Hase Nr. 10 konnte nicht ausgewertet werden, da wegen technischer Mängel des Entwicklers die Filmrollen des Schreibers unbrauchbar waren. Die von uns getesteten Substanzen wurden Hase Nr. 6 und 7 gegeben, Hase Nr. 8

und 11 dienten als Kontrolltiere, denen physiologische Kochsalzlösung unter Versuchsbedingungen gespritzt wurde. S. dazu Tab. Nr. 1 und 2.

C. Ergebnisse

I. Gelchromatographie

Nach der groben Auftrennung des Substanzgemisches unterzogen wir das Material einer Säulenchromatographie: die erreichte weitere Fraktionierung stellt sich dar in einzelnen Gipfeln der Transmission. Jeder peak der Abb. Nr. 2 - 9 entspricht somit einer bestimmten Substanz oder einem Gemisch von Substanzen, die gleichzeitig eluiert wurden. Die Ergebnisse der Originalkurven des Fallbügel-schreibers wurden auf Millimeterpapier übertragen, wobei auf der Ordinate die Transmission in Prozent, auf der Abszisse unten die Nummern der Gläser erscheinen (jede Nummer entspricht einer halben Stunde), in denen die Fraktionen vom Fraktionssammler aufgefangen wurden. Die oben gezeichnete Abszisse zeigt das zu jedem Glas gefundene Elutionsvolumen. In K D II weist z.B. die Fraktion Nr. 30 (= K D 30) die Transmission von 85 auf und erschien bei einem Elutionsvolumen von 411 ml.

K A I: (s. Abb. Nr. 2) Der 1.peak, der vermutlich alle Substanzen über MG 700 enthält, erstreckt sich von Elution 253 - 419 ml. Danach folgen noch 4 Gipfel: peak 2: 514 - 686; peak 3: 686 - 740; peak 4: 740 - 820; peak 5: 820 - 970.

K A II: (s. Abb. Nr. 3) Peak 1 erscheint bei ca. 236 - 390, stimmt fast mit peak 1 in A I überein. Es wurde noch ein 2. Gipfel aufgezeichnet bei Elution 510 - 590, der peak 2 in A I nahekommt.

K A III: (s. Abb. Nr. 4) Peak 1 von 240 - 400, mit 2 Einkerbungen und bei 430 ml taucht ein kleiner

Gipfel zwischen 1 und 2 auf. Peak 2: 472 - 697; peak 3 und 4 liegen eng beieinander, so daß wegen der Zonenspreizung die beiden peaks nur bedingt von einander abzugrenzen sind. Peak 3: 697 - 797; peak 4: 797 - 897; peak 5: 897 - 1147 ml.

K A IV : (s. Abb. Nr. 5) Peak 1: 244 - 321; peak 2: 321 - 372.

K D I: (s. Abb. Nr. 6) Bei den Versuchen K D I - IV sind 12 Gipfel zu unterscheiden, die in den 4 Versuchen unterschiedlich ausgeprägt sind. Peak 1 stellt sich in K D I als Plateau dar: von 243 - 311 ml; dann erscheint ein peak, der in D II und IV in 2 Teile gespalten ist: 311 - 378; Gipfel 4 von 378 - 432; der nachfolgende Gipfel 5 ist sowohl im aufsteigenden wie im abfallenden Schenkel gekerbt und erstreckt sich von 432 - 513. Die Strecke bis peak 9 ist in den Versuchen verschieden ausgebildet. Hier nur 2 peaks: 513 - 594 und 594 - 702. Peak 9 und 10: 702 - 864 mit einem Knick am abfallenden Schenkel. Peak 11: 864 - 1121; peak 12: 1121- 1229 ml.

K D II: (s. Abb. Nr. 7) Der 1. Gipfel ist deutlicher ausgeprägt als in K D I: 233 - 288; peak 2 288 - 329 ml und peak 3: 329 - 356 erscheinen als getrennte, Gipfel 4 mit einer Einkerbung am aufsteigenden Teil: 356 - 411; Gipfel 5 zeigt fast ein zweigipfliges Bild, das in K D I nicht vorhanden war mit einer Elution bei 411 - 480; bis peak 9 erscheinen noch 3 Gipfel: 480 - 534, 534 - 603, 603 - 699; peak 9 von 699 - 781. Der bei D I nur als Einkerbung erscheinende Gipfel 10 ist hier deutlich ausgeprägt: 781 - 863. Peak 11 wieder mit einem sich über 6 Gläser erstreckenden Plateau reicht von 959 - 1137; peak 12: 1137 - 1274. Insgesamt ist das Kurvenbild differenzierter als bei K D I.

K D III: (s. Abb. Nr. 8) Gipfel 1 mit Einkerbungen an auf- und absteigender Seite reicht von 216 - 284; peak 2 und 3 liegen zusammen: 284 - 365; der darauffolgende Gipfel 4 weist hier 2 Einkerbungen am aufsteigenden Schenkel auf: 365 - 419 ml. Gipfel 5 ist schmaler und nur leicht gekerbt: 419 - 486. Peak 6: 486 - 581; peak 7: 581 - 662; peak 8 nur schwach angedeutet: 662 - 702. Gipfel 9 und 10: 702 - 864, wobei peak 10 wie bei D I nur als leichte Einkerbung von peak 9 auftaucht. Der in seiner Plateauform konstante peak 11 reicht von 945 - 1134 ml.

K D IV: (s. Abb. Nr. 9) Deutliche Einkerbung von peak 1: 213 - 279; peak 2 und 3 überlappen sich stark: 279 - 359; Gipfel 4 stellt sich niedriger und breiter dar mit Einkerbung: 359 - 412; peak 5 weist hier 2 Kerbungen des aufsteigenden Teils auf, wobei die Kerbe im absteigenden Schenkel vermißt wird: 412 - 479. Das Verhältnis von 6, 7, 8 gestaltet sich wieder anders: ein deutlicher peak 6: 479 - 572 ist gefolgt von einem gedoppelten peak 7: 572 - 652 und einem schwachen Gipfel 8: 652 - 692; Gipfel 9 erscheint mit fast symmetrischen Schenkeln, peak 10 ist nicht zu sehen; peak 11: 844 - 1104; peak 12 ist nicht aufgezeichnet.

II. Tierversuche

Da die Mengen der in der Säulen-Gelschromatographie gewonnenen Fraktionen sehr klein waren, faßten wir für die Testung am Kaninchen jeweils mehrere Gläser zusammen. Dieses Vorgehen richtete sich nach der Lage der peaks. Wir versuchten, die sich jeweils entsprechenden Gipfel von K A I - IV

und von K D I - IV zusammenzufassen, wobei wir unterstellten, daß ein bestimmter peak z.B. von K A I dem an derselben Stelle liegenden in K A II entspricht, auch wenn sich die Elutionsvolumina der beiden um einige ml unterschieden, da die Durchflußgeschwindigkeit nicht bei jedem Versuch exakt dieselbe war.

Die durchgeführten Tierversuche sind in Tab. Nr. 2 aufgeführt, mit arabischen Nummern versehen; wo sich die gespritzten Fraktionen auf den Chromatogrammen befinden, dann den Abb. Nr. 2 - 9 entnommen werden.

Da die Originalaufzeichnungen der Tierversuche meterlange Filmrollen darstellen, übertrugen wir die gewonnenen Werte auf mm-Papier (s. Abb. Nr. 10 - 29). Die unteren Kurven geben den arteriellen Druck wieder, aufgetrennt in diastolischen und systolischen Druck. Darüber befindet sich die Kurve der Herzfrequenz, darüber der arterielle Mitteldruck. Auf der Abszisse wurde die Zeit aufgetragen: Unmittelbar vor, während und nach der Injektion ist die Übertragung kontinuierlich, d.h. die Werte jeden Herzschlags wurden übertragen, entweder im Abstand von 1 oder 2 mm, was dann auf der Abbildung selbst vermerkt wurde. Überall dort, wo die Übertragung diskontinuierlich wird, wie bei den Werten der Minuten nach der Injektion wurde die Abszisse durch senkrechte Striche unterbrochen. Die Punkte für diese Meßwerte wurden durch gerade Linien verbunden, d.h. die Kurven nicht ausgezeichnet, da die Punkte Mittelwerte für den angegebenen Zeitraum darstellen, meist über die Dauer einer Aus- und Einatmung, entsprechend etwa 10 Systolen und nicht jede Herz-

aktion einzeln dargestellt ist.

Ergebnisse der einzelnen Versuche:

Kontrolltier: (s. Abb Nr. 10 a und b) Das Kaninchen wurde ebenso vorbereitet wie die Tiere, denen wir Testsubstanzen spritzten. Um zu erfahren, ob etwaige Effekte durch die Testsubstanz oder nur z.B. durch Volumengabe hervorgerufen werden, imitierten wir die Versuchsbedingungen mit 1 - 2 ml physiologischer Kochsalzlösung und zeichneten diese Blindversuche in den gleichen Abständen auf. Dabei konnten wir auch die Kreislaufsituation des Hasen über die ganze Versuchsdauer verfolgen, damit Anhaltspunkte finden für die Klärung der Frage, ob auch nach Placebogabe der arterielle Druck des Kaninchens nach einer bestimmten Zahl von Stunden absinkt. Kurz nach Injektion von 2 ml NaCl stieg der arterielle Druck um 12 mm Hg systolisch/14 mm Hg diastolisch = 18/17 % des Ausgangsdrucks an. An diesen Anstieg, der sich noch zweimal reproduzieren ließ (NaCl_② + 8/11 mmHg; NaCl_③ + 8/9 mmHg) schloß sich unmittelbar eine negative Nachschwankung an bei NaCl_② - 8/9 mmHg; bei NaCl_③ - 6/8 mmHg, gerechnet vom Druck vor der NaCl-Injektion. Innerhalb der 1. Minute kehrte der Druck zum Ausgangswert zurück. Die Minutenwerte schwankten gering (max. 3 %) um den Ausgangswert mit fallender Tendenz. Dies läßt sich auch am arteriellen Mitteldruck sehen, der während des ganzen Versuchs allmählich absank. Bei der Beurteilung der Frequenz ist zu berücksichtigen, daß ein Ablesefehler aus den Original-Filmrollen von 10 msec beim Abmessen der Strecke zwischen zwei Herzaktionen nicht zu vermeiden war.

Die Änderungen dieser Intervalle bewegten sich in dieser Größenordnung, so daß wir die Frequenz in dem ganzen Versuch als konstant annahmen. Bei $\text{NaCl}_{(4)}$ und (5) wurde kein Absinken des Blutdrucks vermerkt; die Minutenwerte schwankten uncharakteristisch. Allerdings ist im Vergleich zur Ausgangslage des gesamten Blindversuchs ein stetiger leichter Abfall des Drucks zu verzeichnen: im Verhältnis zur Lage vor NaCl_1 war der Druck vor der Injektion von $\text{NaCl}_{(5)}$ um 14 % syst./12 % diast. allmählich abgesunken, was sich am arteriellen Mitteldruck ebenfalls verfolgen ließ. Die Frequenz verhielt sich unauffällig.

Versuch 1: (s. Abb. Nr. 11) Das Verhalten des Drucks und der Frequenz waren unauffällig.

Versuch 2: (s. Abb. Nr. 12) Keine Auffälligkeiten während des ganzen Versuchs außer eines Anstiegs der Frequenz bei 3 Minuten (entsprechend einem Abfall der Intervalldauer um 20 %), der bei 4 Minuten wieder ausgeglichen war.

Versuch 3: (s. Abb. Nr. 13) Eine schwache Druckerhöhung (7/5 %) während der Injektion normalisierte sich sofort wieder. Sonst keine bemerkenswerten Änderungen.

Versuch 4: (s. Abb. Nr. 14) Der Blutdruck fiel in der 1. Min. um 7/8 % und erholte sich bis zur 5. Min. wieder.

Versuch 5: (s. Abb. Nr. 15) Unmittelbar nach der Injektion lagen zwei Atmungszyklen lang systolischer und diastolischer Druck um 6/7 % über den Ausgangswerten.

Versuch 6: (s. Abb. Nr. 16) Unauffälliger Versuchsverlauf bis auf einen leicht erhöhten Druck im 1. Postinjektionszyklus, gefolgt von einem geringen Blutdruckabfall. Bis zur 7. Min. sank der Druck allmählich ab auf ein Niveau, das den Ausgangswert von Versuch 7 bildete.

Versuch 7: (s. Abb. Nr. 17) Die sehr schwach angedeutete biphasische Reaktion in Versuch 6 war hier ebenfalls vorhanden: Der 1. Atmungszyklus nach der Injektion lag um $4/5$ % niedriger als vor dem Versuch. Sonst keine Auffälligkeiten.

Versuch 8: (s. Abb. Nr. 18) Die biphasische Reaktion von Versuch 6 und 7 zeigte sich hier deutlicher: + $8/11$ % und anschließend - $7/7$ % des Ausgangswerts.

Versuch 9: (s. Abb. Nr. 19) Hier wiederholte sich der Effekt von Versuch 8 nicht mehr. Die Frequenz zeigte sich konstant.

Versuch 28: (s. Abb. Nr. 20) Unauffälliger Verlauf des Versuchs.

Versuch 29: (s. Abb. Nr. 21) Der arterielle Druck zeigte sich während des ganzen Versuchs unauffällig. Bei 3 Min. stieg die Intervalldauer um 11 % an, wurde jedoch nach 1 Minute schon wieder ausgeglichen.

Versuch 30: (s. Abb. Nr. 22) Keine nennenswerten Änderungen der Meßgrößen.

Versuch 31: (s. Abb. Nr. 23) Der während der Injektion konstante arterielle Druck fiel postinjektiös muldenförmig um $13/18$ % des Ausgangswerts ab und erreichte diesen erst wieder in der

4. Min. Von dort an fiel er allmählich wieder ab bis zur 12. Minute. Der muldenförmige Druckabfall fiel zeitlich zusammen mit einem Anstieg der Intervalldauer um 13 %; diese normalisierte sich bis zur 1. Minute, erreichte ihre Spitze von + 22 % in der 7. Minute und fiel wieder auf Ausgangswerte zurück.

Versuch 33: (s. Abb. Nr. 25) Nach 2 Atmungszyklen, während deren der arterielle Druck um $\frac{3}{4}$ % gegen Ende der Injektionsdauer anstieg, wiederholte sich der muldenförmige Druckabfall aus Versuch 31: - $\frac{9}{16}$ %. Bis zur 4. Minute stieg der Blutdruck leicht an, konnte jedoch das Ausgangsniveau nicht mehr erreichen. Der Anstieg der Intervalldauer wie in Versuch 31 war hier fast nicht zu erkennen.

Versuch 34: (s. Abb. Nr. 26) Dieser Versuch verlief unauffällig.

Versuch 35: (s. Abb. Nr. 27) Gegen Ende der Injektion stieg der Druck leicht an (+ $\frac{5}{7}$ %) an. Darauf folgte ein Abfall um $\frac{5}{4}$ %, der nicht so tief war und so lange anhielt wie in Versuch 31 und 33.

Versuch 36: (s. Abb. Nr. 28) Unauffälliger Versuchsablauf.

D. Diskussion

I. Methoden

Material vorliegender Arbeit sind niedermolekulare Substanzen des Kalbsmyokards. Um möglichst nur Gewebebestandteile zu erhalten, mußten die Herzen gründlich durchspült werden. Da es uns nicht möglich war, die schlagenden Herzen mit Spülflüssigkeit zu entbluten - was Nowy als adäquate Methode angibt (12) - und die Befreiung des Gewebes von Blutbestandteilen am gealterten Material wegen der Blutgerinnung unmöglich wird, spülten wir die noch warmen Herzen sofort nach der Organentnahme und erreichten so eine weitgehende, jedoch nicht vollständige Befreiung von Blutbestandteilen.

Verarbeiten des Materials im Eisbad bei 0°C , sofortige Lagerung bei -196°C während des Transports und später bei -18°C hielten sowohl den Einfluß von mikrobiellen Verunreinigungen wie den von enzymatischen, autolytischen Prozessen hintan, so daß ein Zusatz von antibakteriellen Substanzen bzw. von Enzymstoppnern nicht für nötig gehalten wurde.

Das Substanzgemisch unterlag während des Aufarbeitens unphysiologischen Zuständen: Die Homogenisierung führt zur Proteindenaturierung (13) und wurde daher von uns auf höchstens 2 Minuten begrenzt (14). Wegen des Transports konnten wir das Einfrieren des Materials auf -196°C nicht umgehen. Um die zwar geringe Zunahme von Proteinen niedrigeren Molekulargewichts bei gefrorener, gealterter Muskulatur gegenüber frischem Muskel (15) zu verhindern, die als wahrscheinliche Folge von Hydrolyse wohl einhergeht mit einer Zunahme von Proteinbruchstücken - Oligo- und Polypeptiden, Aminosäuren - wurden die Organe am selben Tage weiterverarbeitet. Das wiederholte Auf-

tauen und Einfrieren zieht keine Pherogramm-änderungen von Muskelextrakten nach sich (16), ebenso findet beim Erwärmen von gefriergetrocknetem Material keine Löslichkeitsänderung statt (17).

Das von uns verwandte, zur Gewinnung von Substanzen aus Geweben übliche Verfahren (18), führt zu einer bestimmten Auswahl von Substanzgemischen, die von der Art des Extraktionsmittel abhängt. Das unspezifische hydrophile Gemisch, das wir durch Extraktion mit aqua bidest. gewannen, enthält bei weitem nicht alle Bestandteile des Myokards. Selbst so ubiquitär vorkommende Stoffe wie Acetylcholin, Bradykinin u.a. könnten in unserem Extrakt nicht enthalten sein, da sie spezielle Extraktionsverfahren erfordern (19, 20). Unsere Ergebnisse müssen von daher interpretiert werden als Wirkungen eines begrenzten Auszugs der Myokardbestandteile.

Die Abtrennung von Teilchen mit einem Molekulargewicht von über 30.000 wurde mit dem auf Aronsson (21) zurückgehenden Ultrafiltrierapparat durchgeführt, welcher eine schonende Möglichkeit zur Konzentrierung von Lösungen darstellt, ohne die Proteine zu denaturieren. Auf dem gleichen Prinzip beruhen die Diaflo-Membranfilter: aus der Verwendung einfacher Cellophan-Folien (22) wurde eine Methode zur schnellen Dialyse und sogar Bestimmung des Molgewichts kleinerer Teilchen (23). Für unseren Zweck, das Substanzgemisch zu fraktionieren, schienen uns diese Filter geeignet, obwohl ihre Selektivität keine strenge ist: UM 10, dessen Trennungsgrenze bei 10.000 liegt, läßt bereits ab 25.000 Material durch. So wird Chymotrypsinogen A mit einem Molgewicht von 25.000 nur zu 90 % zurückgehalten (23).

Die Auftrennung des Ultrafiltrates mittels Gelchromatographie stellt ein gangbares Verfahren dar, um eine Auftrennung nach dem Molgewicht (24) weiter voran zu bringen, genauer nach ihrem Moleküldurchmesser (25). Andrews (26,27) konnte zeigen,

daß eine Berechnung des Molekulargewichts von Proteinen mit einer Genauigkeit von 10 % möglich ist. Dies gilt auch für Peptide (28), niedermolekulare Substanzen wie Zucker und Alkohole (29), Kohlenhydrate (30). Eine Methode, deren Prinzip auf dem Moleküldurchmesser beruht, wird beeinflusst von der Ionenstärke (31) des verwendeten Elutionsmittels, das die Größe der Hydrathülle verändert. Die daraus entstehende Möglichkeit, Trennungen geringer Auflösung durch Elution bei erhöhter Ionenstärke zu spreizen (32) nutzten wir zwar nicht aus; dies wäre jedoch eine Möglichkeit die Trennschärfe bei K D I - IV zu steigern, um die sehr eng beieinanderliegenden peaks zu isolieren.

Die Bearbeitung der Fraktion K A beschränkt sich auf die Entsalzung mit G-10. Der Mechanismus dieses Vorgangs, der nach Wasternak vorallem gut in destilliertem Wasser durchzuführen ist, erklärt sich durch Coulombsche Wechselwirkungen in deionisiertem Wasser zwischen Kationen und Carboxylgruppen der Gelmatrix an stark vernetzten Gelen wie G-10. Die Substanzen von K A (MG 10.000 - 30.000) durchliefen die Säule in einem gemeinsamen peak.

Die Charakterisierung der Fraktionen durch ihre Elutionsvolumina genügte uns; es kam uns nur darauf an, reproduzierbare, d.h. wiederauffindbare Fraktionen herzustellen. Die Berechnung des von Laurent und Killander (33) angegebenen Verteilungskoeffizienten der die Elution eines Stoffes unabhängig von den besonderen Versuchsbedingungen (Fassungsvermögen der Säule, Packungsdichte des Gels) darstellt, wäre nur nötig gewesen zum Vergleich mit Arbeiten, die mit anderen Säulen experimentierten.

Die Form der Chromatographiekurven und damit die Elutionsvolumina der einzelnen Substanzen hängt von einer Vielzahl von Einflüssen ab: Der osmotische

Druck von nicht penetrationsfähigen Substanzen wirkt sich auf ihre Elutionsvolumina aus - über eine Änderung des inneren Gelvolumens (34) . Dieser Effekt könnte bei den Versuchen K A I -IV, die mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt wurden, und somit verschiedenen osmotischen Drucken, zu der geringen Differenz der Lage der peaks beigetragen haben. Deswegen haben wir uns bei der Zusammenstellung der Injektionen für die Tierversuche nach dem optischen Bild der Auslaufkurven gerichtet und Substanzen zusammen getestet, auch wenn ihre Elutionsvolumina sich gering unterschieden.

Bei K D trat bei den eng beieinanderliegenden peaks ein anderes Problem auf: aufgrund der Zonenspreizung überlappten sich die Basen der einzelnen Gipfel, so daß eine sichere Trennung derselben wohl nicht möglich war. Ein Effekt, der u.a. auch von der Durchflußgeschwindigkeit abhängt (35), welche von Versuch zu Versuch gering schwankte, obwohl wir zu ihrer Konstanthaltung eine Pumpe benutzten. Wichtig wird diese Überlappung von zwei Elutionspeaks bei solchen Substanzen, die ähnliche Effekte im Tierversuch erzeugten und die sich auf nebeneinanderliegenden Gipfeln befinden. Versuch 32, 33 , 34 wären von daher zu überprüfen, ob nicht ein und diesselbe Substanz die von uns gefundenen Wirkungen verursachte.

Nach der Trennung des Materials in einzelne Fraktionen erfolgte die Testung am Kaninchen-Kreislauf. Zur Feststellung einer pharmakologischen Wirkung gehört notwendig die Reproduzierbarkeit des Effekts bzw. seine statistische Sicherung und danach die Aufstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve. Auf beides mußten wir in dieser Arbeit verzichten. Da wir bei einzelnen Fraktionen nur winzige Mengen gewinnen konnten, wollten wir einen eventuellen Effekt nicht durch Aufteilung der Substanz auf mehrere Versuche gefährden, zudem für eine statistische Auswertung

bei keiner der Fraktionen genügend Substanz vorlag. Daher ist auch nicht ausgeschlossen, daß in Fraktionen, die bei uns kein positives Ergebnis zeigten, Effekte enthalten sein können.

II. Ergebnisse

Neben einer Fülle von Substanzen wie Carnosin, (7, 36), Glutathion (37) oder die von Ilett gefundene steroidähnliche Komponente mit antidiuretischer Wirkung (38), von denen keine Blutdruckwirkung bekannt ist, konnten auch herz- bzw. kreislaufwirksame Substanzen im Herzmuskel aufgefunden werden: Extrakte aus Katzenmyokard enthalten einen cardiotonischen Faktor, Splenitransin - eine wasserlösliche Base mit einem Molekulargewicht von kleiner als 350 - mit kontraktionsfördernder Wirkung auf den isolierten Papillarmuskel der Katze. Obwohl die Isolation z. T. mit Sephadex G-10 durchgeführt wurde, ist ein Vergleich der Ergebnisse ohne zusätzliche Untersuchungen nicht möglich, da mit Aceton extrahiert wurde. (39) Jacob und Maitre stellten aus Kaninchen- und Meerschweinchenherzen proteinfreie Extrakte her, die einen kurzen Blutdruckabfall an der Ratte auslösen, gefolgt von einem Blutdruckanstieg. Der cardiodepressive Teil (40) dieser Fraktion entspricht wahrscheinlich ATP und anderen Phosphorsäureestern des Adenosin, der cardiostimulierende dem Adenosin und einer isopropylnoradrenalinähnlichen Substanz. Der Gehalt an Adrenalin und Noradrenalin konnte für Kaninchen- und Meerschweinchen-Myokard bestimmt werden (41, 42, 43). Neben diesen Substanzen, deren Wirkungen bereits untersucht werden, gibt es eine Reihe von Stoffen, die in ihrer Struktur und Wirkung unbekannt sind (44, 45, 37).

Unsere Arbeit kann nicht mit den oben referierten verglichen werden, die größtenteils

auf elektrophoretischen Untersuchungen beruhen. Haiß (46) dagegen arbeitete mit demselben Material (unserer Fraktion D) und derselben Säule. Er stellte Auslaufkurven her von einem Gesamtextrakt mit einem Molekulargewicht von unter 30.000 (~ einer Mischung von K A - D) s. Abb. Nr. 32 und dem Filtrat des Diaflo-Filters UM 0.5 (~ unserer Fraktion K D) s. Abb. Nr. 33 mit dem Molekulargewicht von unter 500. Wir stellen in der Abb. Nr. 30 die Auslaufkurve von K D II und in Abb. Nr. 31 unsere Tierversuche 1 - 9 und 28 - 36 gegenüber den Ergebnissen von Haiß anhand der Elutionsvolumina der von Haiß identifizierten Substanzen. So läßt sich direkt aus der Zeichnung ablesen, welche Substanzen in jedem einzelnen Versuch enthalten sind. Dieses Verfahren ist nur bedingt zulässig. Zum einen ist Abb. Nr. 6 von Haiß angefertigt von einer Fraktion des Kalbsherzens, die auch größere Bestandteile als unserer Fraktion K D enthält, mithin auch andere peaks ergibt. Zum anderen liegen die Substanzen so nahe beieinander, daß geringe Umrechnungsfehler (die entstehen bei der Übertragung in unsere Kurven, da wir andere 1/2 Stunden-Elutionsvolumina hatten) schon bewirken, daß ein Stoff von einem Glas ins andere "rutscht". Dennoch lassen sich vorläufige Aussagen treffen über den Inhalt der Injektionen, die wir in den Tierversuchen verwendeten. Interessant ist dies vorallem bei den Versuchen, die auffällige Veränderungen der Meßwerte aufwiesen. Der Inhalt der Versuche 28 - 36 ist aufgeschlüsselt in Tab. Nr. 3.

Der Blutdruck bei Versuch 4 erholte

sich rasch nach einem Abfall. Die Versuche 6, 7, 8 zeigten einen biphasischen Blutdruckverlauf: auf einen kurzen Anstieg folgte ein leichter Abfall. Die Herzfrequenz stieg nur bei Versuch 2 leicht an. Über den Inhalt der Versuche 1, 4, 5, 6, 7 und 8 läßt sich aus den Haiß ' schen Ergebnissen kein Aufschluß gewinnen, da die von ihm im Gesamt-extrakt identifizierten Substanzen durchwegs ein zu kleines Molekulargewicht aufweisen, um in K A I - IV enthalten sein zu können.

Anders jedoch bei K D I -IV: die auffälligsten Blutdruckänderungen aller Versuche passierten bei 31, 33, 35, deren muldenförmige Blutdruckabfälle einander sehr ähnlich sehen. In 29 und 31 fanden außerdem Frequenzänderungen statt. Nach Haiß befindet sich in Versuch 31 eine Substanz, die von Donhauser "Peptid A" (47) genannt wurde wegen ihres vermeintlichen Peptidcharakters, jedoch von Haiß als wahrscheinlich bestehend aus Colaminphosphat, eventuell Colamin und einem Abbauprodukt von Colaminphosphat identifiziert werden konnte. Des weiteren fand Haiß bei den Substanzen, die diesselbe Elution aufweisen wie die Fraktion 33 unserer Versuche Taurin und eine Bande in der Hochspannungselektrophorese in Höhe von Asparagin und Glutamin. Taurin findet sich auch in Versuch 31 zusammen mit einer "Substanz B", wenn man die Haiß ' schen Elutionsvolumina auf unsere Auslaufkurven (s. Abb. Nr. 30 und 31) überträgt. "Substanz B" ist wahrscheinlich identisch mit Colaminphosphat. Versuch 35 weist demnach keine ninhydrinpositiven Substanzen mehr auf außer einer Bande in Höhe von Tryptophan. Bei Versuch 29 ist neben Glutathion, Tryptophan und Tyrosin noch eine Substanz enthalten, die Haiß noch nicht identifizieren konnte. Welcher Substanz die beschriebenen Effekte zuzuschreiben sind, müssen weitere Arbeiten entscheiden.

E. Zusammenfassung

Der wasserlösliche Extrakt des Kalbsmyokards wurde mittels Ultrafiltration enteiweißt, eingengt auf Substanzen mit einem Molekulargewicht von unter 30.000 und in 4 Molekulargewichtsklassen aufgeteilt. Durch weitere Auftrennung in der Säulenchromatographie mit dem Dextrangel Sephadex G-10 wählten wir 9 Komponenten des Extrakts (Versuch Nr. 1 - 9) aus im Molekulargewichtsbereich 30.000 - 10.000 und 8 Komponenten (Versuch Nr. 28 - 36) im Molekulargewichtsbereich von unter 500, die wir hinsichtlich ihrer Wirkung auf den arteriellen Blutdruck und die Herzfrequenz am Kaninchen testeten. Die vorliegende Arbeit nimmt sich einen bestimmten, reproduzierbaren, durch das gelchromatographische Auswaschvolumen charakterisierten Ausschnitt der Kalbsmyokardsubstanzen willkürlich heraus und untersucht diesen auf eine Wirkung hin, die ebenfalls willkürlich bestimmt wurde. Diese Durchmusterung von niedermolekularen Stoffen des Kalbsherzens erbrachte Senkungen des systolischen, diastolischen und des Mitteldrucks in den Versuchen Nr. 4, 31, 33, 35 bis zu 18 % des Ausgangswerts; ebenfalls flüchtige biphasische Reaktionen des Blutdrucks in Nr. 6, 7, 8; in 2 Versuchen (Nr. 29 und 31) fanden Frequenzabnahmen bis zu 22 % des Ausgangswerts statt.

Tabelle Nr. 1

Hase Nr.	Tag	Gewicht (Kg)	Urethan/ kg KG (ml/kg)	Vers. dauer	Präp. dauer	Zahl der Frakt.	Besonderheiten
1	5.6.72	3.010	4.65	5 h 45'	1 h	5	am Ende Hyper- tensin, NaCl- Infusion
2	6.6.72	2.040	4.41	3 h 42'	1 h 20'	1	blutiger Urin- abgang, star- ker Druckabfall
3	7.6.72	3.740	3.21	4 h	1 h 37'	6	rechte v.Jug. abgerissen
4	12.6.72	3.470	2.87	4 h 47'	53'	7	Hypertensin
5		2.930					verblutet
6	14.7.72	2.525	2.78	4 h 30'		10	
7	14.7.72	2.825	2.47	3 h	1 h 15'	8	venöse Blutung Muskelzittern der Beine
8	14.7.72	2.505	3.19	3 h 40'	40'		Blindversuch NaCl ^① abnormer Effekt
9	2.3.73	3.750	4.80				verblutet
10	2.3.73	2.450	3.26	3 h 30'	1 h 42'		Blindversuch Film unleserl. da Entwickler zu schwach
11	27.3.73	3.000	3.0	6 h 35'	1 h 20'		Blindversuch

Tabelle Nr. 2

Frakt. Nr.	Hase Nr.	Inhalt	vorhand. Menge (mg)	gespritzte Menge (mg)	gelöst in NaCl (ml)
1	7	K A I: 20 K A II: 30 K A III: 17 K A IV: 31	7,5	7,5	1
2	7	K A I: 21	23,0	23,0	1
3	7	K A I: 22 K A IV: 34	35,6	17,8	0,5
4	7	K A I: 23 K A IV: 35	2,2	2,2	1
5	7	K A I: 24 K A IV: 36	5,6	5,6	1
6	7	K A I: 25 K A II: 37 K A IV: 37	4,5	4,5	1
7	7	K A I: 26 K A II: 38 K A IV: 38	3,6	3,6	1
8	7	K A II: 39 K A IV: 39	0,1	0,1	1
9	7	K A I: 28 K A II: 40 K A IV: 40	11,0	11,0	1
28	6	K D I: 17-23 K D II: 17-21 K D III: 17-21 K D IV: 17-21	107,7	53,85	0,5
29	6	K D II: 22,23 K D III: 22-24 K D IV: 22-24	35,8	17,9	0,5
30	6	K D II: 24-26 K D IV: 25-27	127,8	63,9	0,5
31	6	K D I: 29,30 K D II: 27-30 K D IV: 28-31	350,2	175,1	0,5

Tabelle Nr. 2 (Fortsetzung)

Frakt. Nr.	Hase Nr.	Inhalt	vorhand. Menge (mg)	gespritzte Menge (ml)	gelöst in NaCl (ml)
33	6	K D I: 33-38 K D II: 34-36 K D III: 34-37 K D IV: 34-36	35,5	35,5	1,0
34	6	K D I: 39-43 K D II: 37-44 K D III: 38-44 K D IV: 37-43	97,5	48,7	0,5
35	6	K D I: 44-51 K D II: 45-51 K D III: 45-52 K D IV: 44-61			
36	6	K D I: 54-63 K D II: 52-63 K D III: 53-63	4,0	4,0	1,0

Tabelle Nr. 3

Geschätzter Inhalt der Fraktionen 28 - 37 im Vergleich zu Haiß

Frakt. Nr.	Elutions- volumen (ml)	Inhalt nach Haiß (Abb.6)	Inhalt nach Haiß (Abb.12)
28	226 - 310	Glutathion try, tyr	Unbekannte Substanz
29	287 - 324	Glutathion try, tyr	Unbekannte Substanz
30	329 - 359	Unbekannte Substanz try, orn, lys carn, ser, val ala, gly, arg his, asp, glu leu, thr, met Substanz B y-amino-butter- säure	Unbekannte Substanz Substanz B
31	372 - 412	asp, glu, leu thr, met, ser val, ala, gly arg, his, y-amino-butter- säure "Peptid A" Colamin, Taurin Substanz B	"Peptid A" Substanz B Taurin
33	446 - 513	Taurin Bande in Höhe von asp, glu	Taurin
34	492 - 603	Bande in Höhe von asp, glu	
35	585 - 825	Bande in Höhe von try keine ninhydrin- pos. Substanzen mehr	
36	712 - 868	keine ninhydrin- pos. Substanzen mehr	

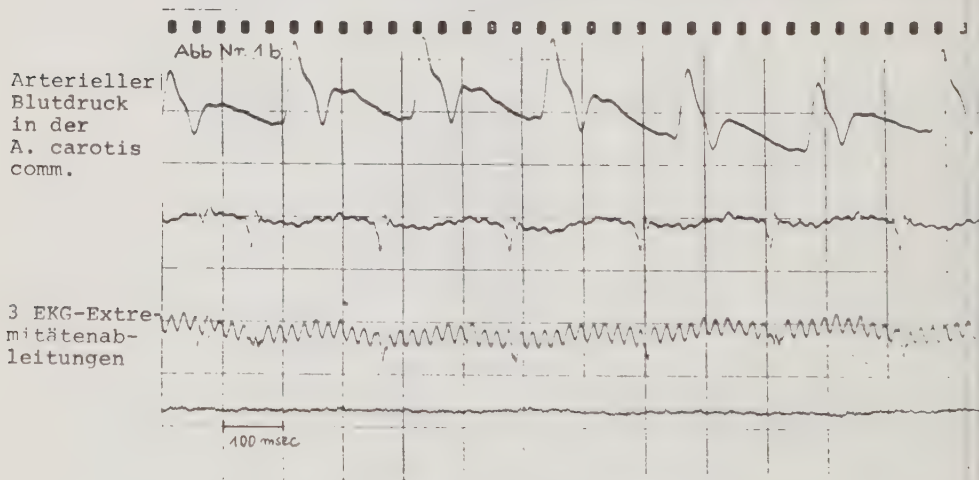
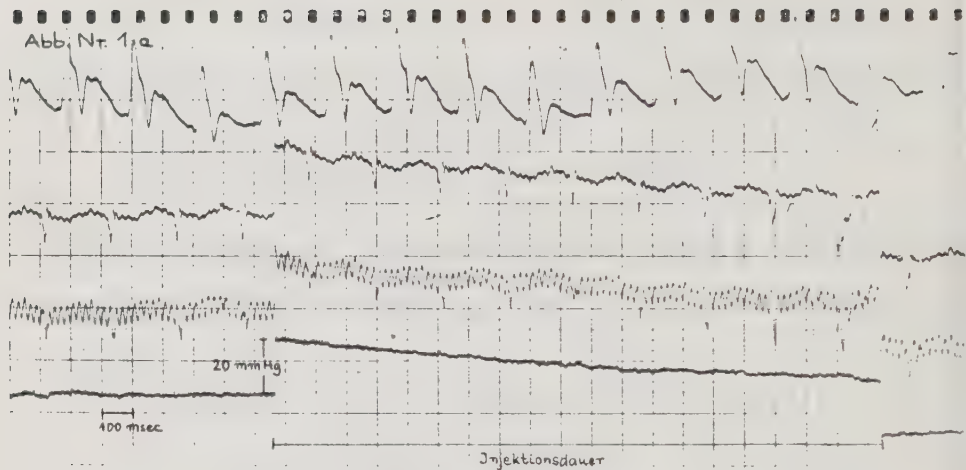


Abb. Nr. 1 a und 1 b: Ausschnitt aus den Original-Aufzeichnungen der Tierversuche. Abb. Nr. 1 a bei Papiergeschwindigkeit 50 mm/sec, Abb. Nr. 1 b bei 100 mm/sec.

SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Gel: Sephadex G-10
 Durchflußmittel: aqua dest.
 Temperatur: + 8 °C
 Säulenhöhe: 1 m
 Fassungsvermögen: 800 ml

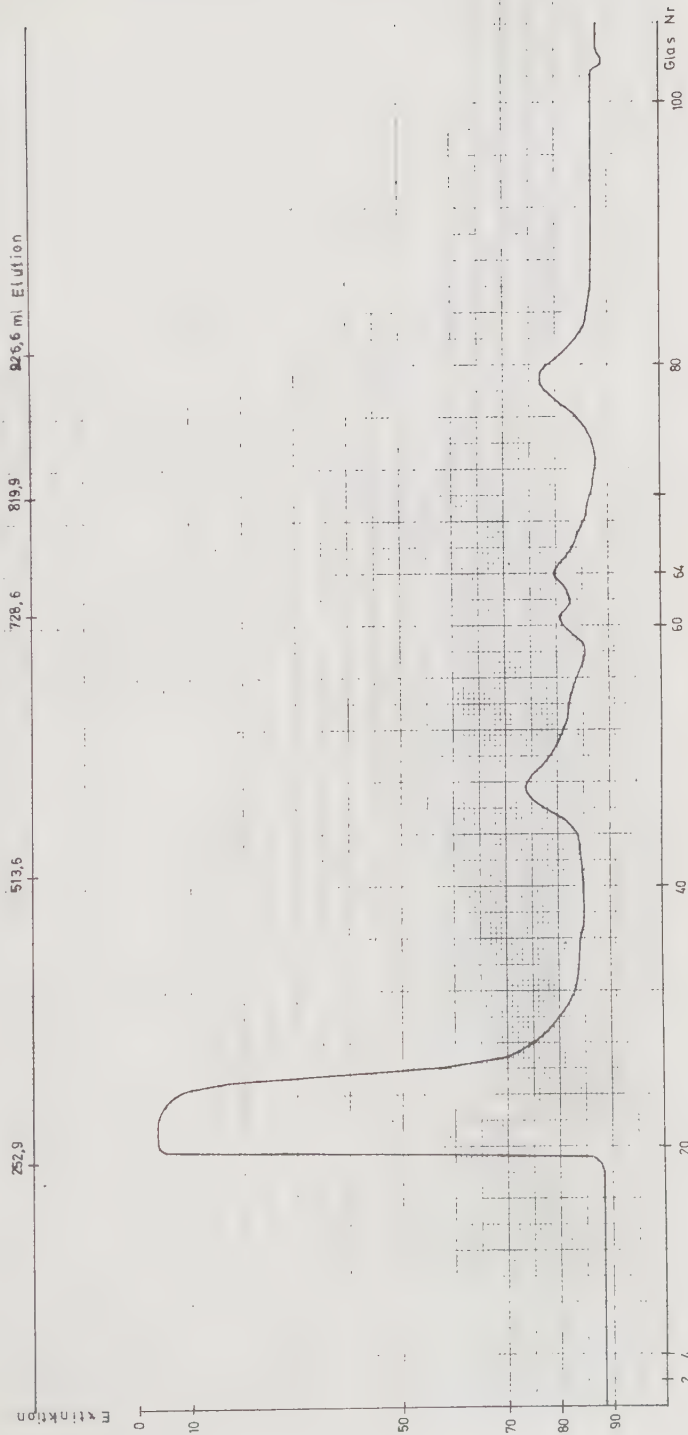
Material: Kalbsherzextraktfiltrat

Bezeichnung: K A 1

Menge: 3 ml

Konzentration: 10 % ig

Diaflo-Filter PM 10 Überstand

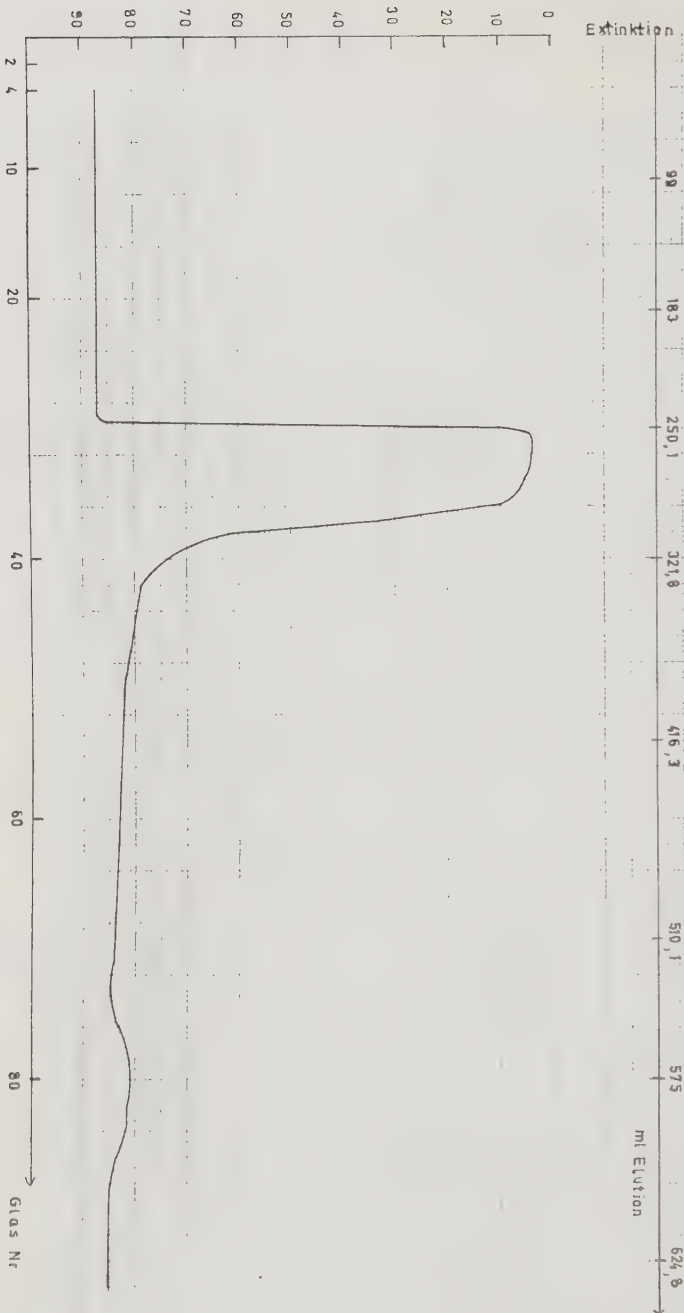


SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Abb. Nr. 3

Gel: Sephadex G-10
Durchflutmittel: aqua dest.
Temperatur: + 8 °C
Säulenhöhe: 1 m
Fassungsvermögen: 800 ml

Material: Kalbsherzextraktfiltrat
Diaflo-Filter PM 10 Überstand
Bezeichnung: K A II
Menge: 3 ml
Konzentration: 5 g/g



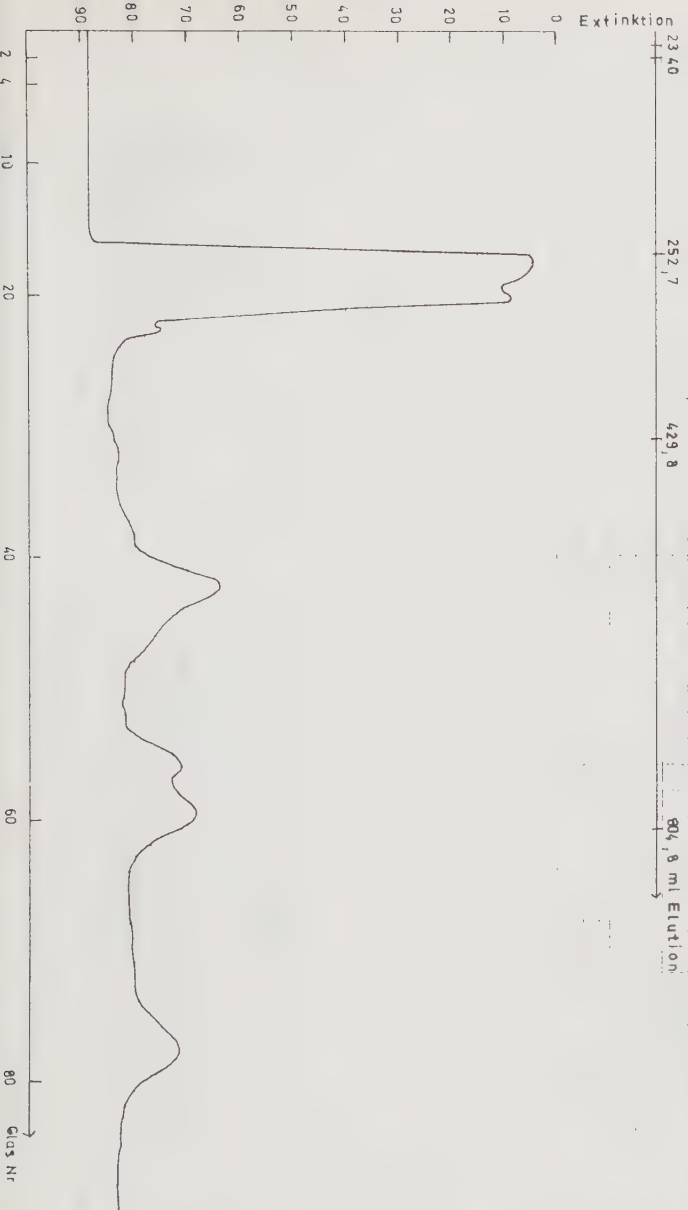
Glas Nr.

SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Abb. Nr. 4

Gel: Sephadex G-10
Durchfließmittel: aqua dest
Temperatur: + 8 ° C
Säulenhöhe: 1 m
Fassungsvermögen: 800 ml

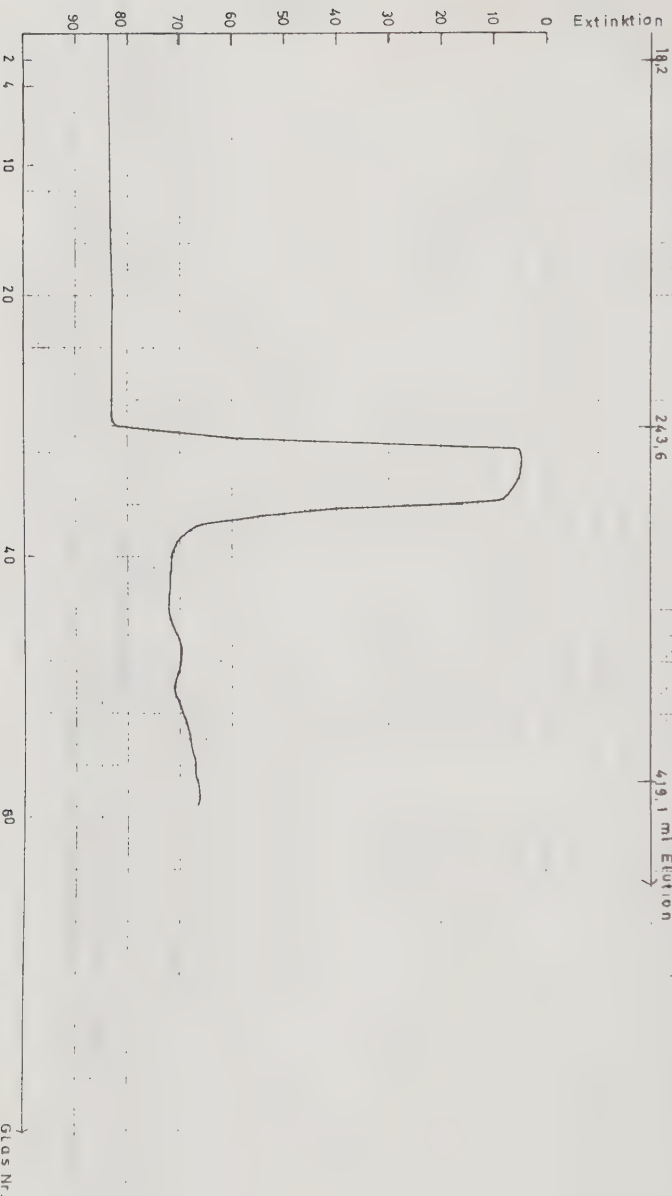
Material: Kalbsherzextraktfiltrat
Diaflo-Filter PM 10 Überstand
Bezeichnung: K A III
Menge 2.5 ml
Konzentration: 20 mg



SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Gel: Sephadex G-10
Durchfluggmittel: aqua dest.
Temperatur: + 8 °C
Säulenhöhe: 1 m
Fassungsvermögen: 800 ml

Material: Kalbsherextraktfiltrat
Diaflo-Filter PM 10 Überstand
Bezeichnung: K A IV
Menge: 3 ml
Konzentration: 5.3 %ig



SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Abb. Nr. 6

Gel: Sephadex G-10
Durchflußmittel: aqua dest.
Temperatur: + 8 °C
Säulenhöhe: 1 m
Fassungsvermögen: 800 ml

Material: Kalbsherzextraktfiltrat
Bezeichnung: K D I
Menge: 3 ml
Konzentration: 10 % ig

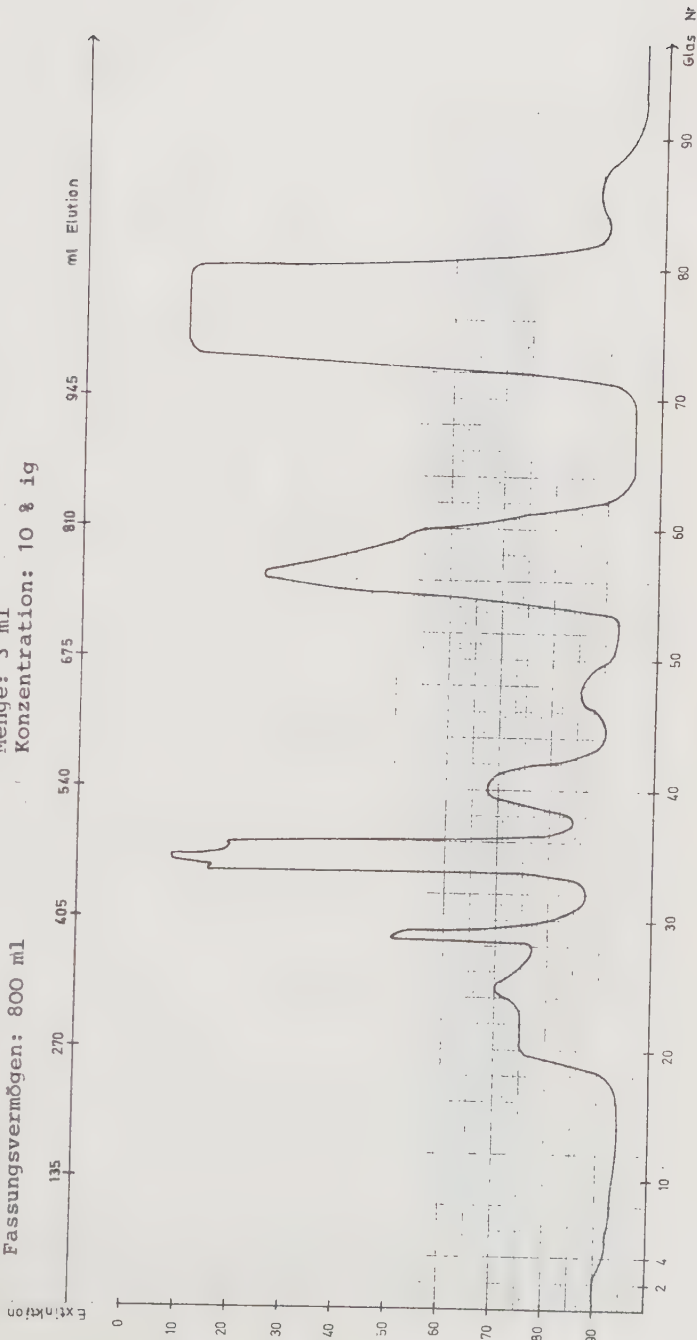
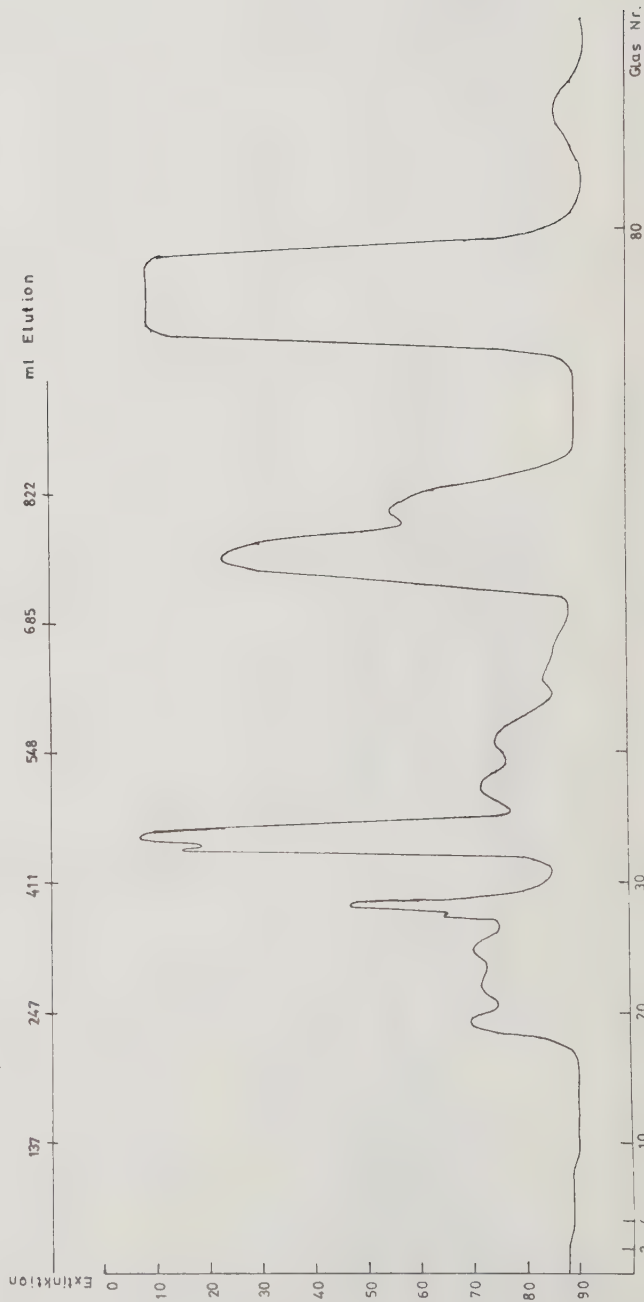


Abb. Nr. 7

SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Gel: Sephadex G-10
Durchfließmittel: aqua dest.
Temperatur: + 8° C
Säulenhöhe: 1 m
Fassungsvermögen: 800 ml

Material: Kalbsherzextraktfiltrat
Bezeichnung: K D II
Menge: 3 ml
Konzentration: 10 %ig



Gel : Sephadex G-10
Durchflußmittel: aqua dest.
Temperatur: + 8 °C
Säulenhöhe: 1m
Fassungsvermögen: 800 ml

Material: Kalbsherzextraktfiltrat
Diaflo-Filter UM 0.5
Bezeichnung: K D III
Menge: 3 ml
Konzentration: 10 % 1g

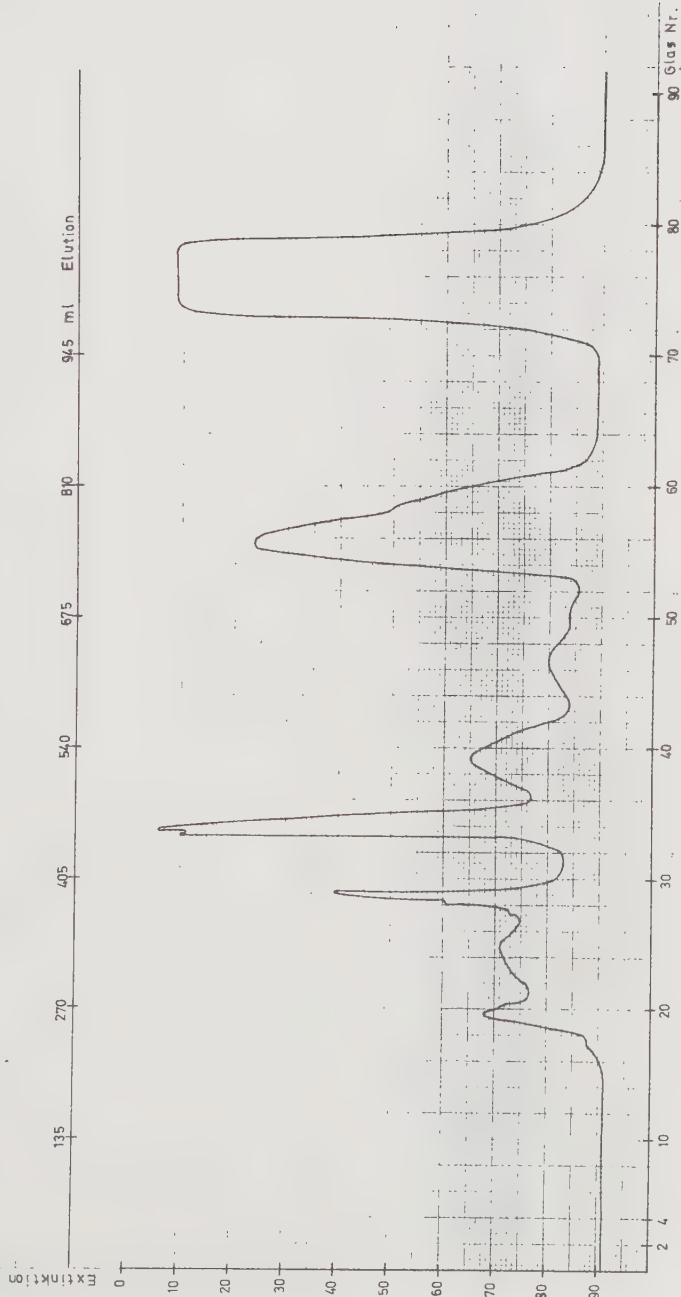
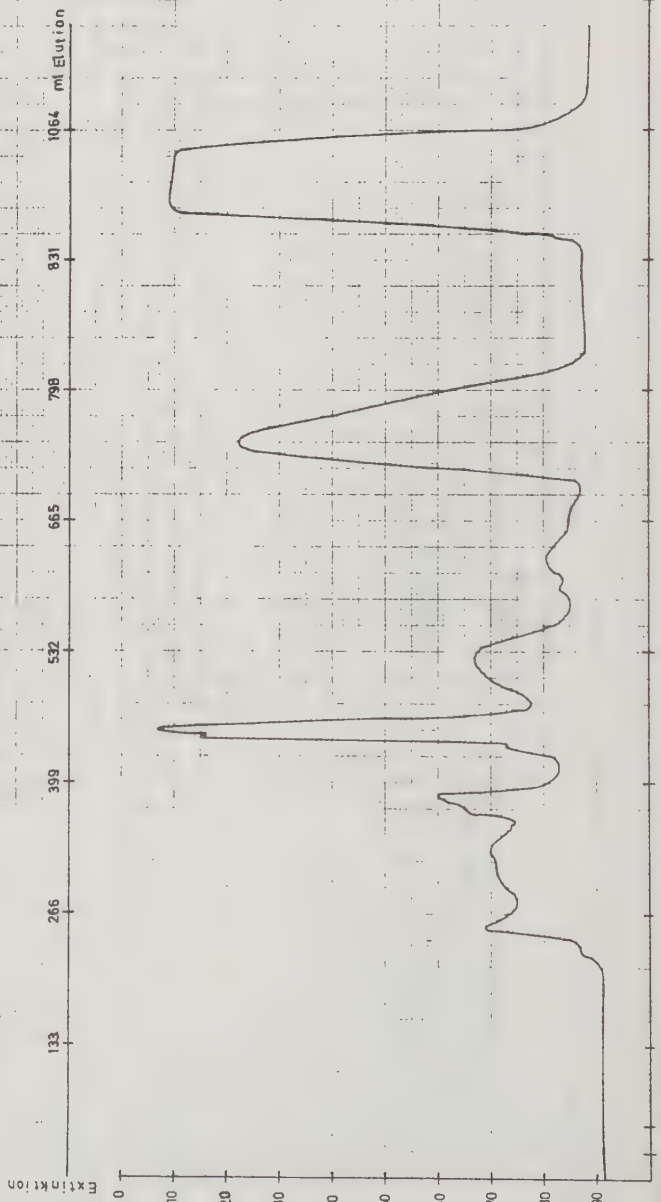


Abb. Nr. 9

Gel : Sephadex C-10
Durchflusmittel: aqua dest.
Temperatur: + 8 °C
Säulenhöhe: 1 m
Fassungsvolumen: 800 ml

SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Material: Kalbsherzextraktfiltrat
Diaflo-Filter UM 0.5
Bezeichnung: W D IV
Menge: 3 ml
Konzentration: 10 %ig



Legende zu den

Abb. Nr. 10 - 28

Darstellung der Tierversuche: die obere Kurve stellt den arteriellen Mitteldruck in mmHg dar. In der Mitte befindet sich die Intervalldauer in msec und darunter der arterielle systolische und diastolische Druck in der a. carotis comm. in mmHg. Die Abszisse für diese drei Ordinaten ist die Zeit, wobei jeder einzelne Herzschlag aufgezeichnet wurde, wenn die Abszisse durchgezeichnet ist. Unterbrechungen durch senkrechte Striche weisen darauf hin, daß diese Werte (vor- allem bei den Minuten-Werten nach der Injektion) Mittel- werte über einen ganzen Atemzyklus darstellen.

Abb. Nr. 10 a

Hase Nr. 11 Blindversuch
1 Punkt/mm

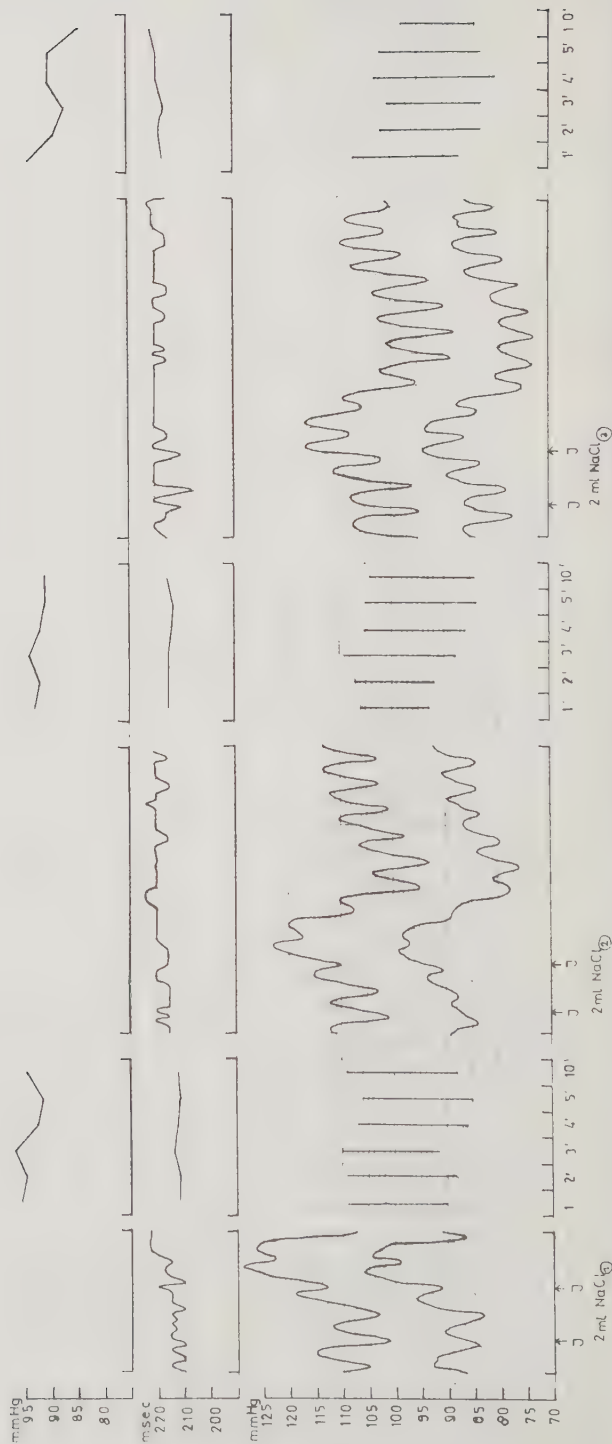


Abb Nr. 10 b

Hase Nr. 11
1 Punkt/mm

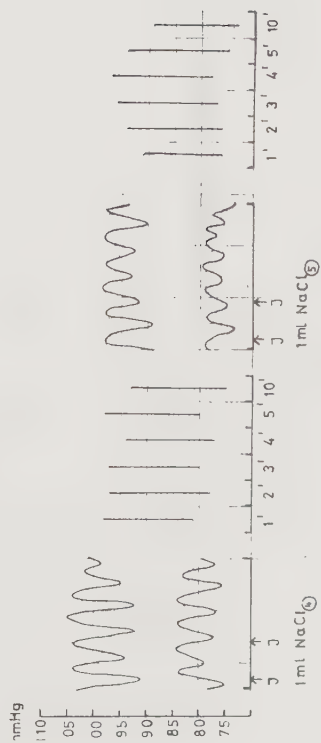
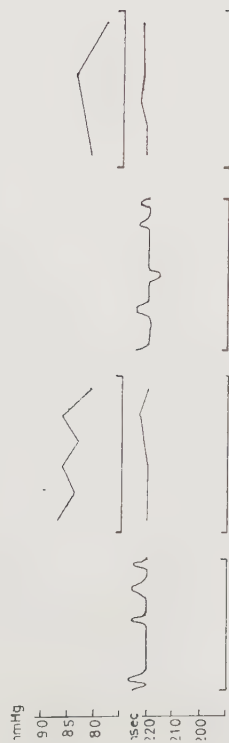


Abb. Nr. 11

Hase Nr. 7

Versuch Nr. 1

Fraktionen: K A I 20
K A II 30
K A III 17
K A IV 31

Menge: 7.5 mg in 1 ml
physiol. NaCl

1 Punkt/2 mm

mm Hg 115
110
105
100
95



msec 260
240
220
200
180



mm Hg 130
125
120
115
110
105
100
95
90
85

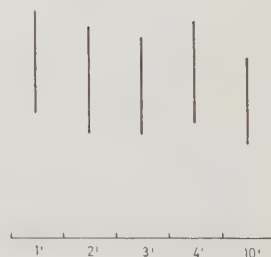
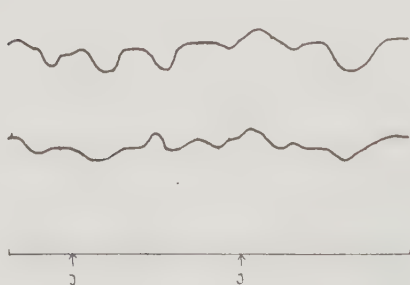


Abb. Nr. 12

Hase Nr. 7

Versuch Nr. 2

Fraktionen: K A I 21

Menge: 23 mg in 1 ml
physiol. NaCl

1 Punkt/ 2 mm

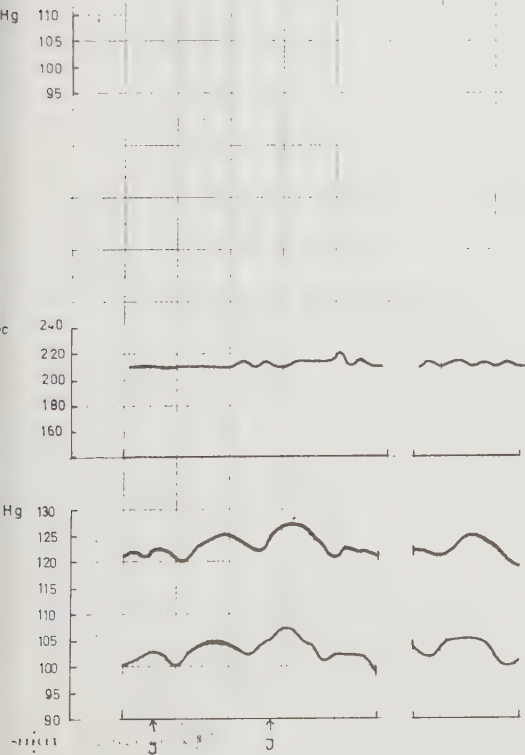


Abb. Nr. 13

Hase Nr. 7

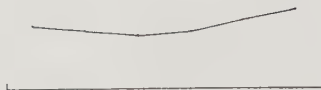
Versuch Nr. 3

Fraktionen: K A I 22
K A IV 34

Menge: 17.8 mg in 0.5 ml
physiol. NaCl

1 Punkt/2 mm

mm Hg 115
110
105
100



msec 240
220
200
180



mm Hg 130
125
120
115
110
105
100
95
90
85
80

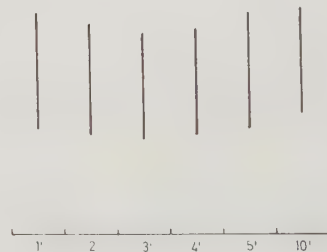
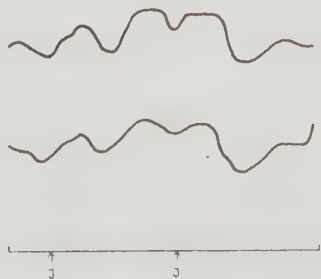


Abb Nr. 14

Hase Nr. 7
Versuch Nr. 4

Fraktionen: K A I 23
K A IV 35

Menge: 2.2 mg in 1 ml
physiol. NaCl
1 Punkt/ 2mm

110
105
100
95



220
200
180



135
130
125
120
115
110
105
100
95
90
85

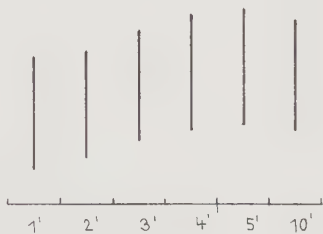
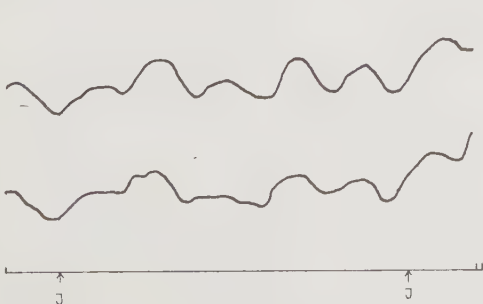


Abb. Nr. 15

Hase Nr. 7
Versuch Nr. 5

Fraktionen: K A I 24
K A IV 36

Menge: 5.6 mg in 1 ml
physiol. NaCl

1 Punkt/2 mm

mm Hg
120
115
110
105



msec
240
220
200



mm Hg
130
125
120
115
110
105
100
95
90
85

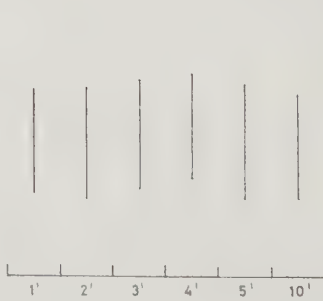
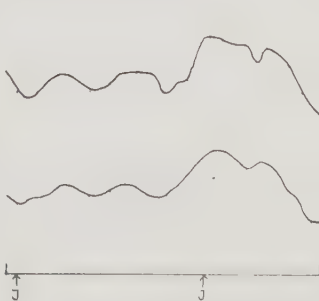


Abb. Nr. 16

Hase Nr. 7

Versuch Nr. 6

Fraktionen: K A I 25
K A II 37
K A IV 37

Menge: 4,5 mg in 1 ml
physiol. NaCl

1 Punkt/2mm

Hg

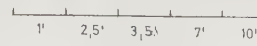
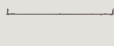
110
105
100
95

ec

240
220

Hg

125
120
115
110
105
100
95
90
85
80
75



1' 2,5' 3,5' 7' 10'

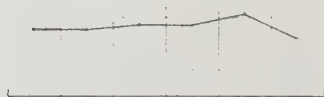
Abb. Nr. 17

Versuch Nr. 7
Hase Nr. 7

Fraktionen: K A I 26
K A II 33
K A IV 38

Menge: 3.6 mg in 1 ml
physiol. NaCl
1 Punkt/ 2 mm

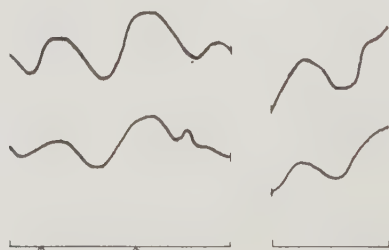
mmHg 105
100
95
90
85
80



msec 250
230
210



mmHg 125
120
115
110
105
100
95
90
85
80
75
70
65



1' 2' 3' 4' 5' 10'

Abb. Nr. 18

Versuch Nr. 3

Hase Nr. 7

Fraktionen: K A II 39

K A IV 39

Menge: 0.1 mg in 1 ml
physiol. NaCl

1 Punkt / 2mm

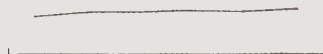
mmHg

90
85
80



msec

260
240
220



mm Hg

115
100
105
95
90
85
80
75

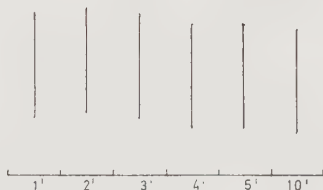
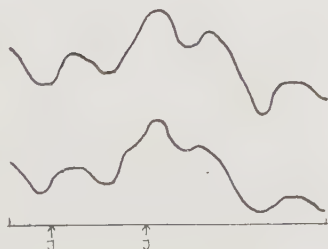


Abb. Nr. 19

Versuch Nr. 9

Hase Nr. 7

Fraktionen: K A I 28
K A II 40
K A IV 40

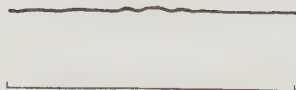
Menge: 11.0 in 1 ml
physiol. NaCl

1 Punkt/2 mm

mm Hg 105
100
95
90
85
80
75



msec 280
240
220
200



mm Hg 130
125
120
115
110
105
100
95
90
85
80
75
70

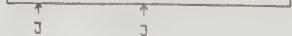


Abb. Nr. 20

Versuch Nr. 28

Hase Nr. 6

Fraktionen: K D I: 17-23
 K D II: 17-21
 K D III: 17-21
 K D IV: 17-21

Menge: 53.85 mg
 in 0.5 ml
 physiol. NaCl

1 Punkt/2 mm

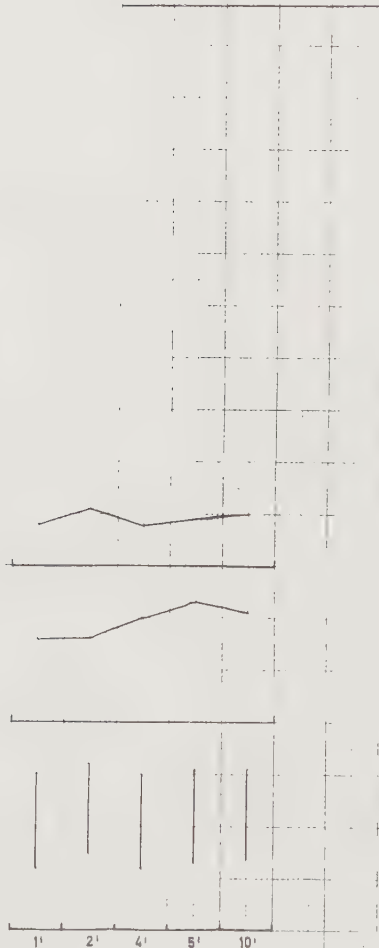
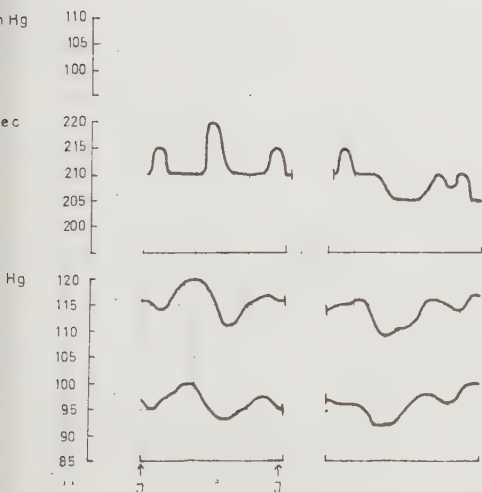


Abb. Nr. 21

Versuch Nr. 29

Hase Nr. 6

Fraktionen: K D II: 22,23

K D III: 22-24

K D IV: 22-24

Menge: 17.9 mg in 0.5 ml
physiol. NaCl

1 Punkt/2mm

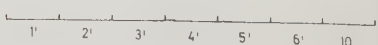
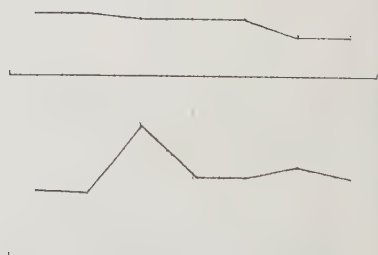
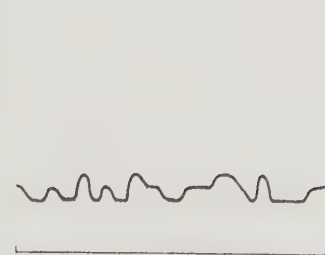
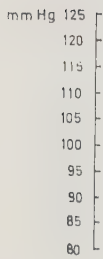
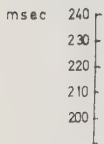
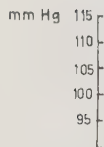


Abb. Nr. 22

Versuch Nr. 30

Hase Nr. 6

Fraktionen: K D II: 24-26

I' D IV: 25-27

Menge: 63.9 mg in 0.5 ml
physiol. NaCl

1 Punkt/mm

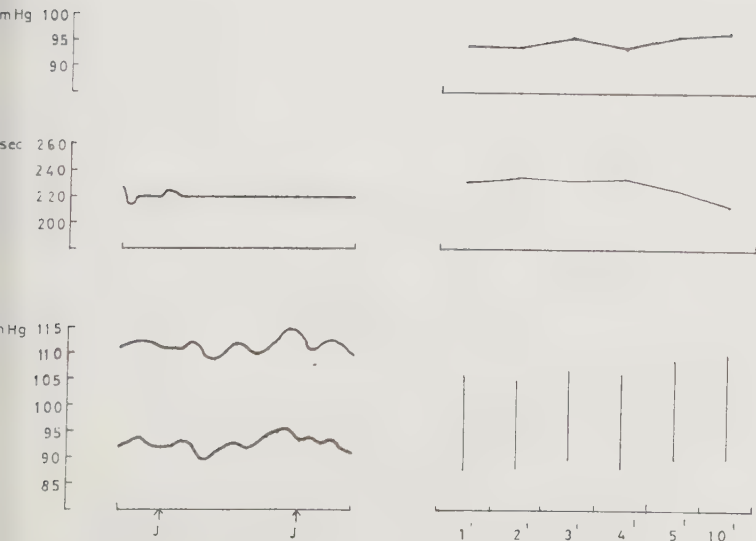


Abb. Nr. 23

Versuch Nr. 31

Hase Nr. 6

Fraktionen: K D I: 29,3

K D II: 27-3

K D IV: 28-3

Menge: 175.1 mg in 0.5 ml
physiol. NaCl

1 Punkt/mm

mm Hg 100
95
90
85

msec 280
260
240
220
200

mm Hg 115
110
105
100
95
90
85
80
75
70
65

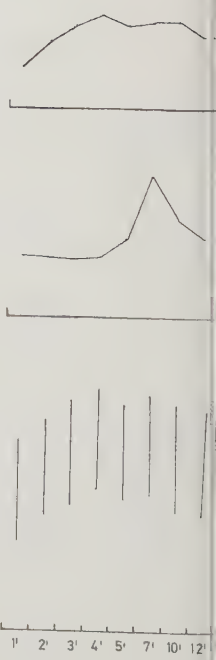
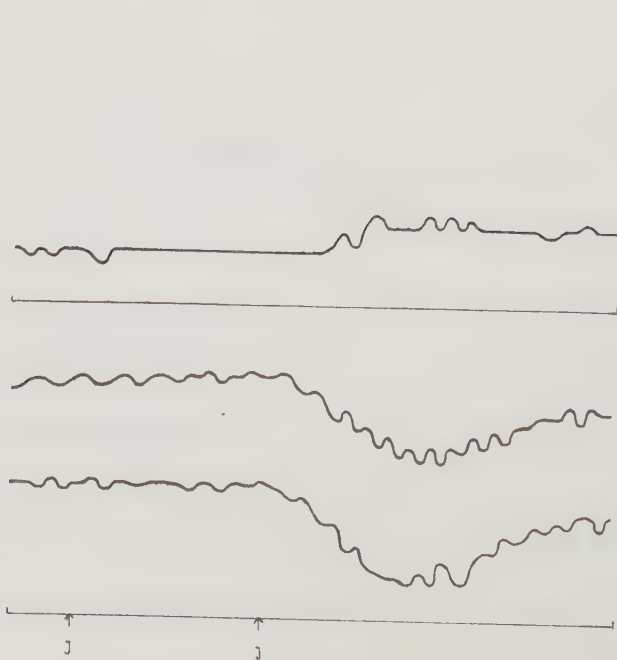


Abb. Nr. 25

Versuch Nr. 33
Hase Nr. 6

Fraktionen: K D I: 33-38
K D II: 34-36
K D III: 34-37
K D IV: 34-36

Menge: 35.5 mg in 1.0 ml
physiol. NaCl

1 Punkt/2 mm

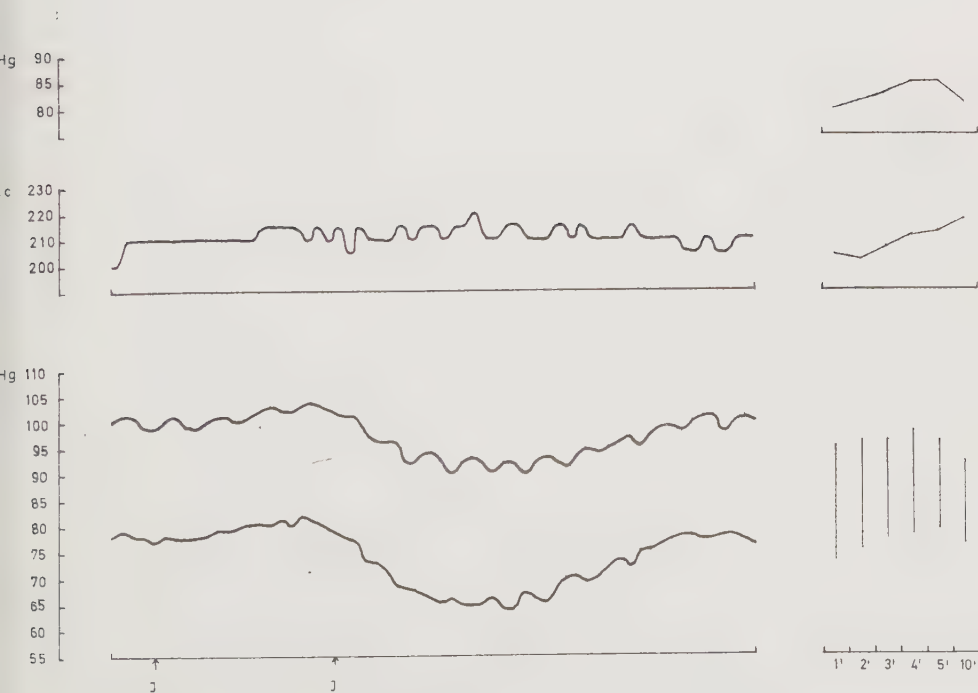


Abb. Nr. 26

Versuch Nr. 34

Hase Nr. 6

Fraktionen: K D I: 39-43

K D II: 37-44

K D III: 38-44

K D IV: 37-43

Menge: 48.7 mg in 0.5 ml
physiol. NaCl

1 Punkt/ 2 mm

mmHg

90
85
80
75



msec

230
220
210
200



mmHg

100
95
90
85
80
75
70



Gerät defekt

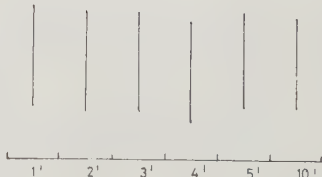


Abb. Nr. 27

Versuch Nr. 35

Hase Nr. 6

Fraktionen: K D I: 44-51

K D II: 45-51

K D III: 45-52

K D IV: 44-61

Menge:

1 Punkt/ 2 mm

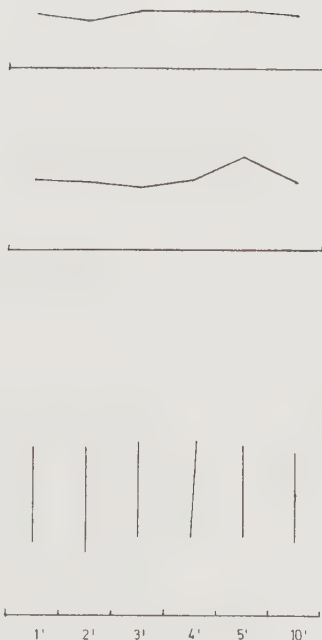
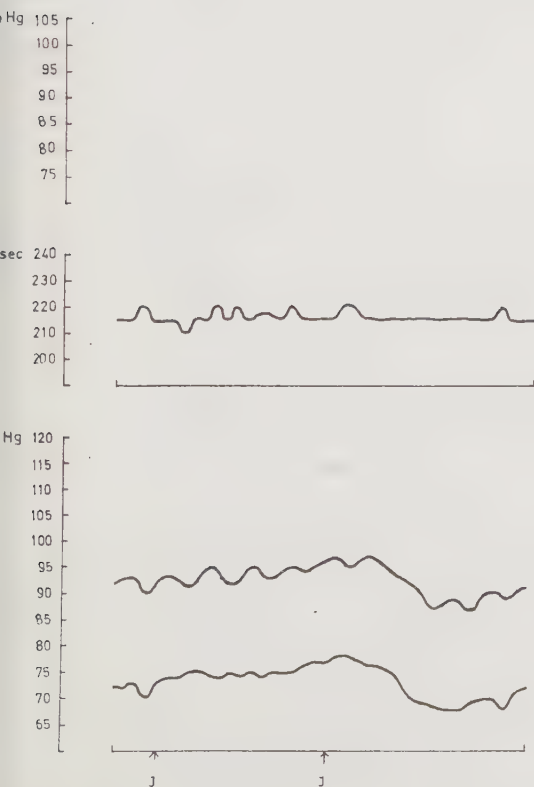


Abb. Nr. 28

Versuch Nr. 36

Hase Nr. 6

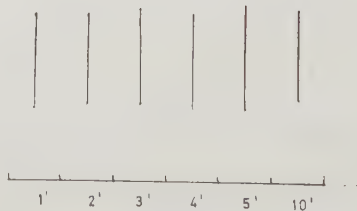
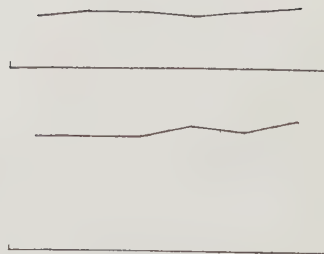
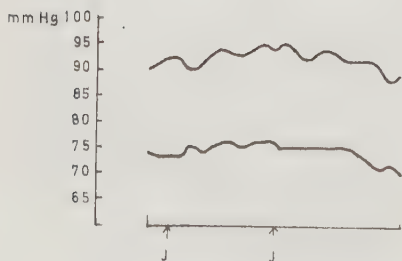
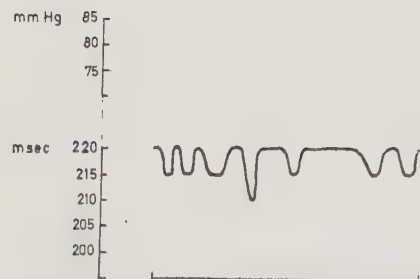
Fraktionen: K D I: 54-6

K D II: 52-6

K D III: 53-6

Menge: 4.0 mg in 1.0 ml
physiol. NaCl

1 Punkt / 2 mm



Legende zu Abb. Nr. 30

Die Abbildung vergleicht die Auslaufkurve des Materials mit dem Molekulargewichtsbereich unter 500 mit den von Haiß hochspannungselektrophoretisch gewonnenen Ergebnissen bezüglich des Inhalts dieses Ausschnitts der Kalbsmyokardsubstanzen.

Der oberste Teil der Abbildung gibt die Haiß'schen Resultate (Haiß Abb. Nr. 6) wieder, die dieser aus dem Gesamtextrakt der Substanzen im Molekulargewichtsbereich 30.000 - 0 gewonnen hat. Darunter befinden sich die Ergebnisse (Haiß Abb. Nr. 12) über das Filtrat des Filters UM 0.5 (Molekulargewichtsbereich unter 500) dessen Komponenten unserer Fraktion K D (Versuche Nr. 28 - 36) entsprechen. Aus dem Schaubild kann somit direkt entnommen werden, welche Substanzen nach Haiß in den jeweiligen peaks der Auslaufkurve K D II zu erwarten sind.

Legende zu Abb. Nr. 31

Diese Synopse der Elutionsvolumina der von uns getesteten Komponenten der Tierversuche Nr. 28 - 36 (oberster Teil der Abb.) mit den hochspannungselektrophoretischen Ergebnissen von Haiß zeigt auf, welche Substanzen in unseren Versuchen nach Haiß zu erwarten sind. Der mittlere Teil der Abbildung gibt die Substanzen wieder, die Haiß im Gesamtextrakt des Molekulargewichts von unter 30.000 fand, der untere Teil jene im Bereich von unter 500, entsprechend unserer Fraktion K D. Versuch Nr. 36 mit der Elution von 712 - 868 ml z.B. enthält nach Haiß somit keine ninhydrinpositiven Substanzen mehr. S. dazu auch Tab. Nr. 3, die den nach Haiß geschätzten Inhalt unserer Tierversuche exakt aufschlüsselt.

Abb. Nr. 30

asp glu leu
ser val ala

HAIB Abb. Nr. 6

unk. Peptid A
lys
try orn
tyr carn
glut. ion subst B Taurin x

x Bande in Höhe von
asp glu leu

xx Bande in Höhe
von try
+ Colamin

keine ninhydrinpos.
Substanzen mehr

HAIB Abb. Nr. 12

Peptid A
Substanz B
unbekannte S. Taurin
274 411

SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Gel: Sephadex G-10
Durchflußmittel: aqua dest
Temperatur: + 8 °C
Säulenhöhe: 1 m
Fassungsvermögen: 800 ml

Material: Kalbsherzextrakt-
filtrat
Filter UM 0.5

Bezeichnung: K D II

Menge: 3 ml

Konzentration: 10 %ig

Elution

959 ml

822

685

548

411

274

137

0

10

20

30

40

50

60

70

80

90

100

110

120

130

140

150

160

170

180

190

200

210

220

230

240

250

260

270

280

290

300

310

320

330

340

350

360

370

380

390

400

410

420

430

440

450

460

470

480

490

500

510

520

530

540

550

560

570

580

590

600

610

620

630

640

650

660

670

680

690

700

710

720

730

740

750

760

770

780

790

800

810

820

830

840

850

860

870

880

890

900

910

920

930

940

950

960

970

980

990

1000

1010

1020

1030

1040

1050

1060

1070

1080

1090

1100

1110

1120

1130

1140

1150

1160

1170

1180

1190

1200

1210

1220

1230

1240

1250

1260

1270

1280

1290

1300

1310

1320

1330

1340

1350

1360

1370

1380

1390

1400

1410

1420

1430

1440

1450

1460

1470

1480

1490

1500

1510

1520

1530

1540

1550

1560

1570

1580

1590

1600

1610

1620

1630

1640

1650

1660

1670

1680

1690

1700

1710

1720

1730

1740

1750

1760

1770

1780

1790

1800

1810

1820

1830

1840

1850

1860

1870

1880

1890

1900

1910

1920

1930

1940

1950

1960

1970

1980

1990

2000

2010

2020

2030

2040

2050

2060

2070

2080

2090

2100

2110

2120

2130

2140

2150

2160

2170

2180

2190

2200

2210

2220

2230

2240

2250

2260

2270

2280

2290

2300

2310

2320

2330

2340

2350

2360

2370

2380

2390

2400

2410

2420

2430

2440

2450

2460

2470

2480

2490

2500

2510

2520

2530

2540

2550

2560

2570

2580

2590

2600

2610

2620

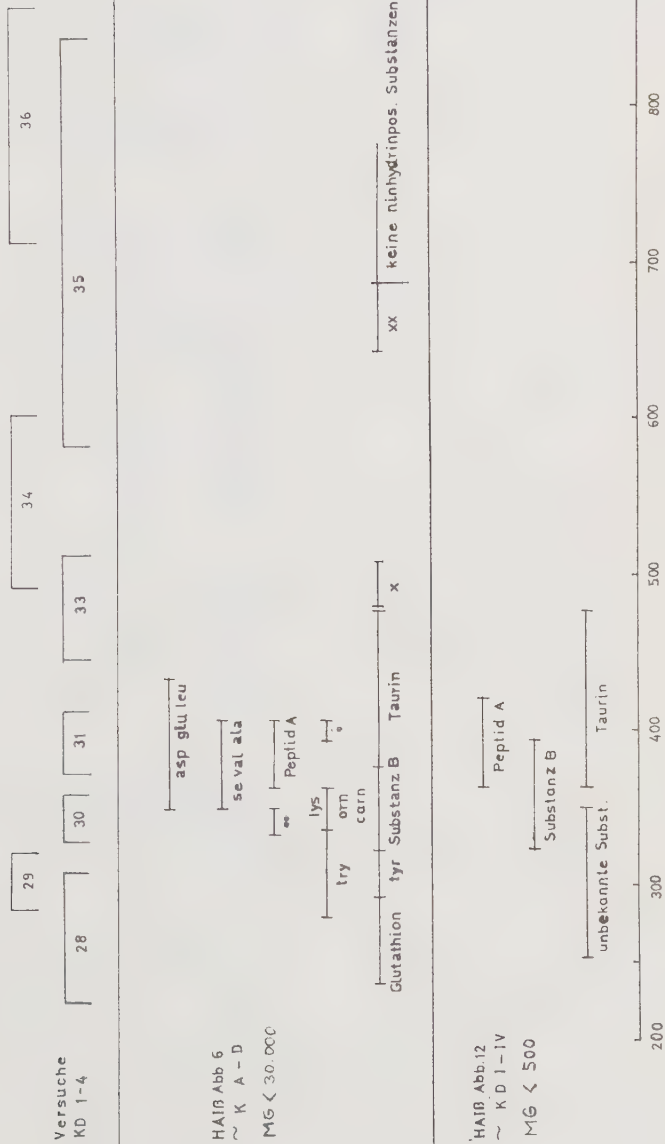
2630

2640

2650

Abb. Nr. 31

Vergleich der Versuche 1 - 9 und 28 - 37
mit den Ergebnissen von HAIß anhand der
Elutionsvolumina.



F. Literaturverzeichnis

1. Clotten R. und Clotten A.
Hochspannungselektrophorese
Thieme, Stuttgart 1962
2. Rehn J. und Ziegler E.
Neue Gesichtspunkte zur Pathogenese
des Kollapses
Dtsch. Med. Wschr. 83, 560 (1958)
3. Mertz D.P. Über das Wesen der Kininhormone
Wiener Klin. Wschr. 79, Nr. 10, 169 (1967)
4. Guggenheim M.
Die biogenen Amine
S. Karger-Verlag, Basel 1951
5. Wollheim E. und Nast H.-P.
Ein humoraler Faktor in der Genese der
essentiellen Hypertonie
Klin. Wschr. 49, heft 7, 426 (1971)
6. Glenn T.M., Lefer A.M. et al.
Production of a myocardial depressant
factor in cardiogenic shock
Americ. Heart J. 82, no 1, 78 (1971)
7. Crush K.G. Carnosine and related substances in
animal tissues
Comp. Biochem. Physiol. 34, 3 (1970)
8. Determan H. Gelchromatographie
Springer, Heidelberg 1967
9. Andrews P. The Gel-Filtration behaviour of pro-
teins relate to their molecular weights
over a wide range
Biochem. J. 96, 595 (1965)
10. Andrews P.
Estimation of the molecular weights
of proteins by Sephadex gel filtration
Biochem. J. 91, 222 (1964)
11. Einhäupl K.
Diss. München, erscheint demnächst
12. Nowy H. und Seitz W.
Elektrophoretische Untersuchungen des
fixierten Kaninchenherzens
Z. ges. exp. Med. 126, 1 (1955)
13. Poel W.E. Science 108, 390 (1948)
14. Stern R und Bird L.H.
Biochem. J. 44, 635 (1949)

15. Kromann und Winnterbottom
Post-mortem changes in the water soluble
proteins of bovine skeletal muscle du-
ring aging and freezing
J. Agric. food Chem. 8, 67 (1960)
16. Bauer H., Glötzner F. et al
Elektrophoretische und immunoelektropho-
retische Studien über Muskelproteine
Klin. Wschr. 42, 1198 (1964)
17. Mackenzie A.P. and Luyet B.J.
Freeze-drying and protein denaturation
in muscle tissues, losses in protein
solubility
Nature 215, 83 (1967)
18. Temple DM.
Isolation techniques for pharmacologi-
cally active substances (animal)
Ann. Rev. Pharmacol. 9, 407 (1969)
19. MacInosh F.C.
Methods Med. Res. 3, 78
Year Book publishing company 312, (1950)
20. Elliott D. F.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 35 (1963)
21. Aronsson T.
A simple apparatus for ultrafiltration
The scand. J. of Clinical and Lab. In-
vest. 9, no. 1, 95 (1957)
22. Craig L. C. et al
Dialysis Studies Part II, some experi-
ments dealing with the problem of
selectivity
J. of the Americ. Chem. Soc. 79, 3729
(1957)
23. Blatt W. F. and Hudson B. G. et al
Nature 216, 511 (1967)
24. Porath J. and Flodin P
Gel filtration: A method for desalting
and group separation
Nature 183, 1657 (1959)
25. Siegel L. M. and Monty K. J.
Biochim. Biophys. Acta 112, 346 (1966)
28. Carnegie P.R.
Estimation of molecular size of peptides
by gel filtration
Biochem. J. 95, 9 (1965)
29. Goodson J. M. et al
Calibration of tightly cross-linked gel
filtration media for determination of
the size

- of low molecular weight, non-inter-
acting solutes
J. Chromatogr. 54, 43 (1971)
30. Povey N. und Holm R. A.
J. Chromatogr. 46, 33 (1970)
31. Sweetman L. und Nyham W.L.
J. Chromatogr. 32, 662 (1968)
32. Wasternak C.
Gel Chromatography of low molecular
weight compounds
Pharmacie 27, 67 (1972)
33. Laurent T.C. and Killander J.
A theory of gel filtration and its
experimental verification
J. Chromatogr. 14, 317 (1964)
34. Edmond E., Farquhar S., Dunstone J. R.
The osmotic behaviour of Sephadex
and its effect on chromatography
Biochem. J. 108, 755 (1968)
35. Tracey M. V. and Winzor D. J.
Interpretation of zonal asymmetry
in gel filtration
Arch. Biochem. Biophys. 117, 184 (1966)
36. Christman A. A.
Determination of anserine, carnosine
and other histidine compounds in
muscle extractives.
Anal. Biochem. 39, 181 (1971)
37. Tjutcev N., Mäsiar P.
The metabolism of protein substances
in muscle tissues. A study of nin-
hydrinpositive substances isolated
from non-protein extracts from the
heart of normal rats.
Physiol. Bohem. 13, 565 (1964)
38. Ilett K. F., Lockett M. F.
Renally active substance from heart
muscle and blood
J. Physiol. 196, 101 (1968)
39. Jackson D. M., Temple D. M. et al.
The distribution of a cardiotonic
factor, splenitransin in mammalian
tissues.
Comp. Biochem. Physiol. 30, 419 (1969)
40. Jacob J., Maitre L.
Analyse chromatographique et phar-
macologique d'extraits de coeurs de
lapin et de cobaye.

41. Davies F., Francis E. T. B., Stoner H. B.
J. Physiol. Lond. 106, 154, (1947)
42. Wollenberger A., Karsch M. L.
J. Pharmacol. 105, 447 (1952)
43. Harvey S. C.
Americ. J. Physiol. 183, 559 (1955)
44. Kothny K. Hochspannungselektrophoretische Untersuchungen der freien Aminosäuren des Kalbsherzens
Inaug. Diss. München 1968
45. Biserte G., Boulanger P., Paysant P.
Papierchromatische Bestimmung von Aminosäuren und Polypeptiden in biologischem Milieu.
Bull. Soc. Chim. biol. 40, 2067 (1958)
46. Haß F. Isolierung einer ninhydrinpositiven hydrolysierbaren Substanz aus dem Kalbsmyokard
Inaug. Diss. München 1973
47. Donhauser S.
Über hydrolysierbare, ninhydrinpositive Bestandteile des Myokards
Inaug. Diss. München 1968

Ich danke Herrn Prof. Dr. Nowy für das Überlassen
des Themas und seine freundliche Unterstützung
bei der Durchführung der Arbeit.

Frau Krülle möchte ich danken für ihr wertvolles
Mithelfen am Gelingen dieser Arbeit.

Lebenslauf:

Am 28. März 1949 wurde ich als erstes Kind des Braumeisters Karl Schmid und seiner Ehefrau Therese, geb. Wiedenmann in Augsburg geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule Täferlingen, dem Wohnort meiner Eltern, trat ich in das Neusprachliche Gymnasium der Englischen Fräulein zu Augsburg ein, an dem ich 1968 das Abitur ablegte.

Im Herbst 1968 schrieb ich mich an der Universität München für das Fach Medizin ein, legte nach zwei Semestern das Vorphysikum, nach weiteren drei das Physikum ab. Mein Medizinstudium schloß ich im Juni 1974 mit der Ärztlichen Prüfung ab.

Z. Zt. leiste ich an der II. Med. Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing meine Medizinalassistentenzeit ab.

